

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医療機器・医用材料の
安全性評価手法開発に関する研究

平成16年度 ～ 18年度

総合研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成19年（2007）年4月

目次

I. 総括研究報告

医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究	総-1
土屋 利江	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I 総合研究報告

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

医療機器・医療材料の安全性評価手法開発に関する研究

主任研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

本研究では、評価試験系の開発と共に、既存の材料における実際の臨床上の安全性との関係について検討を実施し、臨床との相関性を持った試験方法、ガイドラインを開発する。具体的には、次の課題について取り組み、以下の研究成果を得た。

1. 感染因子含有材料の *in vivo* 動態評価手法の開発

大腸菌乾燥菌体コラーゲンシートの腹腔内埋植試験を行った結果、菌体添加量に比例して炎症反応が増強され、腹腔内に適用材料に適切な LPS 規格値を設定する必要があることが判明した。大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを背部皮下に埋植した際に誘導される炎症反応は菌体重量として同用量の黄色ブドウ球菌乾燥菌体によっても惹起された。一方、大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを骨欠損部に埋植した時に観察される骨再生の顕著な遅延は LPS を持たない黄色ブドウ球菌乾燥菌体含有コラーゲンシートでは起こらなかった。生体適合性を改善した高純度酸処理ゼラチンシートを徐放担体として使用し、*in vivo* 抗菌試験を実施した結果、CAP-18/LL-37 類縁体 (18-mer LLKKK 置換体) は、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌に対して顕著な抗菌活性を示し、新規抗菌成分として有効であることが確認された。

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法

医療用具に対して最終滅菌を行い、その結果の判定を生物指標の死滅などから評価し、文書化して後、製品が出荷される。これが滅菌バリデーションである。滅菌バリデーション実施後に生残する生物指標は損傷菌である。損傷菌は健常菌とは生育性能や栄養要求が異なる。損傷菌の生育を判定できる方法を確立しないと滅菌後に損傷菌が生存したとしてもその生育を確認出来ないことになる。つまり滅菌効果を過大評価することになる。このことは医療用具の安全性を確保する意味で無視できない。そこで、損傷菌の生育性能回復に有効な薬剤の評価、損傷菌の迅速な回復ならびに培地メーカー間の変動をなくすことが普遍的な滅菌バリデーションの確立にとって不可欠となる。EOG、ガンマ線あるいは電子線滅菌で損傷を受けたそれぞれの生物指標菌を用いて、損傷回復剤の効果について明らかにした。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

LLNA における各種非 RI 指標について検出感度を比較した。感作性物質をマウスの耳に塗布した後、耳介リンパ節の重量、リンパ節細胞数、BrdU 取り込み量、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量を測定し、SI 値を求めた。リンパ節細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量の SI 値は、BrdU 取り込み量やリンパ節重量の SI 値に比べ高い値を示した。今回検討した中では Tween 80 を添加して塗布する方法が最も SI 値が高くなった。本法

でコラーゲンを主とする医療機器の抽出液について試験したが感作性は認めなかった。タンパクアレルギーをアジュバントと混合して投与すると、血中総 IgE 抗体価の著しい上昇を示し、即時型アレルギー性の有無の評価と相関性が認められた。OVA では著しい抗体価の増加を認めたが、BSA による増加は少なかった。また、タンパク製医療機器の生理食塩水抽出液では抗体価は増加せず、即時型アレルギーを起こす可能性は少ないと判断した。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

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

5. Ti 合金材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発

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

6. スtent用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

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

7. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

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

8. 医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発

人工心臓弁を体に埋植した際の血栓形成やパルス形成の原因となる遺伝子多型を探索することを目的として、健常者 100 名の血液由来 DNA と人工心臓弁使用者 10 名の血液を用いて、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの薬効関連遺伝子や生体における炎症反応などに関連する遺伝子など 11 遺伝子について計 29SNP を選択し、タイピングを行った。引き続き人工心臓弁使用患者からの血液検体を集め、SNP タイピングを行い最終的な解析を行っていく予定である。

9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

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

10. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

DBT については低濃度での神経毒性が示され、注意が必要ではあるが、人工硬膜については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られる。また、アストロサイトを使った神経系毒性評価は、細胞死の他、機能面、増殖の検討も有用と考える。

11. 脊椎固定器具等の力学的安全性評価手法の開発

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

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

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

分担研究者
 土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所
 療品部 部長
 齋島由二 国立医薬品食品衛生研究所
 療品部 室長
 新谷英晴 国立医薬品食品衛生研究所
 療品部 室長
 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所
 環境衛生化学部 室長
 佐藤道夫 国立医薬品食品衛生研究所
 療品部 室長
 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所
 療品部 主任研究官
 小林郁夫 東京医科歯科大学
 生体材料工学研究所 助手
 松永佳世子 藤田保健衛生大学
 医学部 教授
 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所
 療品部 主任研究官
 迫田秀行 国立医薬品食品衛生研究所
 療品部 研究員
 角田正史 北里大学 医学部 助教授
 堤 定美 京都大学再生医科学研究所
 ナノ再生医工学研究センター 教授
 脇谷滋之 大阪市立大学
 医学部 講師

の起源故に品質管理が難しい欠点を持つ。中でも、極微量で様々な生物活性を発現するエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) の混入は品質管理上の大きな問題となる。注射用医薬品の LPS 規格値は適用部位に応じて日本薬局方により定められている。一方、医薬品と比較して複雑な組成を持ち、適用部位も様々である医療機器の場合、公的な LPS 規格値は設定されていないのが現状である。医療機器に関する LPS 規格値は注射用医薬品の同規格値を参考として、製品中の LPS 総含量に基づいて自主的に設定される例が多い。しかし、医療機器や医用材料に混在する LPS の生体に対する実際のリスク強度を正確に判定するためには、製品の適用部位や生体内分解挙動などを評価する必要がある。これらの背景から本研究では、医療機器のグラム陰性細菌汚染による生体影響を評価し、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 LPS 又は菌体を添加したコラーゲンシートを試料としてラット埋植試験を行い、組織や臓器への影響、創傷治癒及び骨再生に対する影響について検討した。創傷被覆剤は、擦傷、火傷、糖尿病時の皮膚疾患のほか、生体内に適用する止血剤などにも多用されているが、患部への微生物感染が起り、治癒の遅延が見られることが少なくない。そこで本研究では、LPS 中和活性及び様々な細菌に対する抗菌活性を持つ分子量 18 kDa の Cationic Anti-microbial Protein の活性ドメインペプチド (ヒト CAP-18/LL-37) を利用した新しいタイプの抗菌材料の開発を目指し、CAP-18/LL-37 類縁の 1 つである 18-mer LLKKK アナログを化学合成し、LPS 中和活性、in vitro 及び in vivo 抗菌活性を評価すると共に、徐放基材の開発に関して検討した。

A. 研究目的

医療機器・医療材料の安全性評価試験系の開発と、既存の材料における実際の臨床上の安全性との関係についても検討を実施し、臨床との相関性を持った試験方法、ガイドラインを開発することを目的とする。具体的には、以下の 1 2 課題について取り組む。

1. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発

高い生体適合性を持つ天然医用材料は、そ

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

医療用品の安全性を確保するために最終滅菌され、一定の無菌性保証レベル (SAL) が確保され、その結果は再現されなければならない。生物指標を用いる無菌性保証の結果は使用される培地性能に拠って影響を受け、また生物指標の滅菌後の損傷の程度に拠って得られる培地性能の結果が異なる。そこで異なる培地メーカー、損傷の程度が異なる生物指標ならびに滅菌方法が異なる損傷菌を用いて再現性の得られる無菌性保証法の確立方法について検討した。乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌、EOG、ガンマ線滅菌ならびに電子線滅菌に用いられる生物指標菌を用い、それらの滅菌で損傷を受けた生物指標菌について検討した。得られた結果は再現性の良い滅菌バリデーション方法の開発に繋がる。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

医療機器による免疫毒性のうち最も試験法が進んでいるのは皮膚感作性で、モルモットを用いた試験が確立した方法として各種ガイドラインに採用されている。近年、マウスを用いた LLNA が OECD ガイドラインに採用され、医療器具への適用も考えられている。しかし、LLNA は RI を使用するため、我が国では実施できる施設が限られており、代替として RI を用いない各種改良法が提案されているものの、十分な評価は得られていない。そこで、同一処理して得たリンパ節について各種非 RI 指標を用いて反応性を測定し、それぞれの指標の検出感度を比較した。一方、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の解析は新たな測定指標として期待されており、B220 陽性細胞、CD4 あるいは CD8 陽性細胞比率の増加によって感作性と刺激性とを区別できると報告されている。そこで、こうした細胞表面抗原解析が感作性の評価

に有効であるかどうかを検討した。更に、動物を用いない *in vitro* 法についても、将来的に医療機器への適用が可能かどうか検討した。

医療機器の感作性はその抽出液で試験することになる。ISO 10993-12 では、極性及び非極性溶媒それぞれで抽出することとされ、生理食塩水や植物油などが上げられ、エタノール溶液などの有機溶媒も提案されている。そのため、抽出溶媒によって試験結果が変化する可能性がある。LLNA では水系溶媒を用いた抽出液は動物への塗布が困難であり、なんらかの工夫が必要となる。また、抽出液の試験は多種の化学物質の併用と考えられ、こうした共存物質によって感作性物質の反応性が変化するかどうか検討した。

医療機器の即時型アレルギー性は皮膚感作性以上に生命の危機に直結する重大な問題であるが、これを評価する確立した試験法はない。近年、タンパクアレルギーの評価指標として血清抗体価を指標とするのが有用ではないかと考えられており、いくつかのタンパクアレルギーと医療機器の抽出液について試験し基礎的データを収集した。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

本研究では、医療機器の安全性を評価するために、現行のガイドラインには記載されていない新しい手法の開発を行うことを最終目的とする。その一環として、近年、広汎に使用されつつあるチタン・ニッケル (Ti/Ni) 合金の安全性評価手法の開発を行う。Ti/Ni 合金は、形状記憶という優れた性能があるため、適用範囲がステントを含め、拡大しつつある。しかし、ニッケル (Ni) を多く含んでいるため、そのリスクの程度を評価できる手法を開発する必要がある。まず、公定法に掲載されている金属・合金に関する規格、試験法を調査することから始める。米国の整形外

科インプラントの不具合報告から、金属に係するものを抽出し、再整理すると共に、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する。また、Ni や Ti についてのアレルギー不具合報告を検索する。さらに、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すると共に、全不具合報告を整理し、機器分類別に集計して、その傾向を掴む。一方では、Ti/Ni 合金を含む関連金属の動物への埋植を行い、同一ロット材料の溶出試験などを総合して、試験法の総括を行う。

5. Ti 合金材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究

金属材料は現在用いられている医用材料の中でも最高レベルの強度を持ち、高い力学的強度が要求される埋植医療機器の材料として不可欠である。構造の複雑化や使用期間の長期化など様々な要因によって、不具合の報告件数は年々増加傾向にある。そのため、力学的強度や耐腐食性能を高めるための研究が活発に展開されているが、生物学的安全性や有効性を向上させるための研究は十分に進んでいない。特に近年、優れた力学的特性を持つ医用金属材料が数多く開発され、臨床実態を反映するような生物学的安全性および有効性評価手法の確立が強く望まれている。

従来から使用されている Ti-6Al-4V は、構成元素のひとつである V に強い細胞毒性があることから、最近ではその安全性が疑問視されている。様々な金属塩の正常ヒト骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響を評価した結果、V 塩は骨芽細胞の増殖を最も強く阻害

する金属塩のひとつであり、Al 塩は骨芽細胞の増殖には全く影響を及ぼさない濃度で分化を強く阻害することが明らかになった。これらから、Ti-6Al-4V は、V による骨芽細胞の増殖阻害に加え、Al による分化阻害を起こす可能性が強く示唆された。近年、構成元素に V を含まない Ti 合金や、V と Al を両方とも含まない Ti 合金が開発されている。さらに、骨芽細胞の増殖および分化を促進させる元素を配合すれば、Ti-6Al-4V より骨組織適合性を向上させることも可能だろう。

我々は、培地に添加した Nb 塩が正常ヒト骨芽細胞の分化を促進させることを明らかにした。さらに、ハイドロキシアパタイトに添加した Nb イオンが、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を促進させることも確認した。一方、Nb を添加した Ti-Zr 基合金が最近開発され、特に Nb を 8 mol% 以上添加した β 型 Ti-Zr-Nb 合金は、Ti 系金属材料としては弾性率が小さく、生体用金属材料として力学的に興味がある。本研究では、最近開発された各種の Ti 合金等について細胞毒性および骨芽細胞適合性を評価した。そして、Ti-Zr 基合金およびその構成純金属等の細胞毒性試験、骨芽細胞適合性試験およびラット大腿骨埋植試験を実施した。

6. ステンツ用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

動脈等の狭窄など、循環器疾患の中でも動脈硬化症や血管閉塞症、動脈瘤など血栓が関わる疾患は多い。動脈硬化による血管狭窄や血管の閉塞に対する治療としては、PTCA カテーテルを使用した経皮的冠動脈形成術 (バルーンによる狭窄部の拡張) などの他、ステントによる狭窄部の拡張や人工血管への置換などが行われている。

ステントには大きく分けて、バルーン拡張型と自己拡張型の 2 種類がある。前者はステ

ントをカテーテル内に納めて病変部まで移動させ、ステント内側のバルーンを膨張させることによって必要な管径までステントを押し広げるタイプのもので、主としてステンレス鋼がその素材として使われている。術後のバルーンは縮小させて回収し、ステントだけを病変部に残す。

一方後者は、Ti-Ni 超弾性合金製で、カテーテル内に押し込めた状態で病変部まで到達し、そこでカテーテルから引き出すことによって超弾性変形が回復することによってステントを拡張し、狭窄部の解消をはかるものである。

前者の素材となるステンレス鋼にはおよそ 8~10mass%の Ni が含まれており、後者の超弾性合金の Ni 濃度は 50%にも及ぶ。Ni の生物学的安全性はアレルギー性、発がん性などが懸念されており、術後も長く血管内に留置されるステントに使用することを不安視するむきもある。

通常、金属（合金）によるアレルギー性や細胞毒性などの生体為害性は溶出したイオンが原因となって引き起こされることが多く、そうした為害性を低減させ、生物学的安全性を高めるためには耐食性の高い合金を使用することが望ましい。このことはステント用合金についても同じで、アレルギー性などが懸念される Ni を含む Ti-Ni 合金やステンレス鋼の生体内での耐食性評価の必要性は高い。

また、今後使用量の増加が予想されるステント市場において、医療費を抑制するためには、使用量のほとんどを占めている高額な輸入製品を廉価な国産製品に切り替えることが有効であり、低廉な価格のステントの開発が望まれている。製造プロセスの観点から見て、ステントのコストのほとんどは加工費と材料の歩留まりにかかっており、現状のようなレーザー加工による切り出しでは、コスト

を低減させることは難しい。そこで新しい廉価なステント製造プロセスとして期待されているレーザー溶接を応用したステントを想定し、ステント用 Ti-Ni 合金ワイヤーレーザー溶接部の耐食性評価も行う必要がある。

さらには、生物学的安全性の高い新しい吸引ステント用合金の開発を目指し、Au を主成分とするステント用合金開発を行う。開発した合金は、力学的安全性を担保するための力学的性質、生物学的安全性を担保するための耐食性評価と血液適合性評価を行い、多角的・総合的な評価を行う。

7. 医歯科材料・インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発

医歯科材料・インプラントによる皮膚科的不具合事例は、主に金属アレルギーの観点から国内・国外において報告されている。インプラント機器による皮膚科的不具合には腐食などによる皮膚刺激と、金属によるアレルギー反応が推定される。インプラントの金属材料によるアレルギー反応を証明する確実な方法は現在もパッチテストと呼ばれる皮膚テストである。パッチテストに適した金属の化合物の種類と濃度ならびに基剤を決定することは、発症機序解明に不可欠であり、より安全な材料改良に貢献することが期待される。

金属は組織のなかで溶出しイオン化することがアレルギー反応の条件になる。このことは下腿など骨接合用金属が皮膚（表皮と真皮）に近く接する部位の症例が障害例として多く報告されているからも支持される。原因金属としてはコバルト、ニッケル、クロムの症例が多い。コバルト、ニッケル、クロムについてはパッチテストの至適濃度も決定され試薬も入手しやすい。しかし近年インプラントとして使用頻度が増加しているチタン合金の成分はアレルギー症例が極めて稀で

あるために、これを証明するパッチテストの方法がまだ確立されていない金属も存在する。

本研究はインプラント機器による皮膚科的不具合事例を臨床データおよびパッチテストなどによる皮膚アレルギー検査によって、不具合の原因、インプラントの組織適合性評価を行うことによって、インプラントによる皮膚科的症例の安全性評価手法の開発を行うことを目的とした。

8. 医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発

心臓弁膜症は、心臓病の最大の原因の一つとして挙げられ、人工弁置換手術による治療が行われている。現在、臨床的に用いられている人工弁は、1) 機械弁、2) 異種生体弁、3) 凍結保存同種弁である。しかし、それぞれの特徴として、機械弁は耐久性は高いが抗血栓性に大きな問題があり、異種生体弁は抗血栓性は高いが耐久性が低く、凍結保存同種弁は抗血栓性、耐久性、抗感染性に優れているもののその提供数が圧倒的に不足しており、その性能はいずれも一長一短である。わが国における人工弁の利用は約 80%が機械弁、残り約 20%が異種生体弁である。米国においては約 50%が機械弁、約 45%が異種生体弁、3%が同種弁、残りが自己弁であると報告されている。この様に現在国内外で最も多く利用されている人工弁は機械弁である。人工心臓弁の機能不全の主な原因としては、血栓形成とパンヌス（心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織）形成が挙げられる。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために置換手術後は生涯にわたり抗血液凝固薬及び抗血小板凝集薬服用が必要となるが、薬の作用の個体差により血栓が形成された場合には急速な人工心臓弁機能不全を招く恐れがある。また、パンヌスの形成についてはそ

のメカニズムは明らかにされておらず、体質（個体差）による可能性も否定できない。大動脈弁の置換術後における人工弁機能不全は、患者の生命を危機に曝す重大な問題である。

そこで本研究では、人工心臓弁を体に埋植した際の血栓やパンヌスの形成の原因となり得る遺伝子多型を探索することを目的として、人工心臓弁使用者の中で人工心臓弁の機能不全が認められる患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いて両者を比較検討する。まず、血栓形成の原因を探るために抗血液凝固薬であるワーファリンの薬効に関連する遺伝子を対象として、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に SNP タイピングを行い、さらに、パンヌス形成の原因を探ることを目指して、生体における免疫系や炎症反応に関わる transforming growth factor β (TGF β) に着目し、TGF β とそのレセプターの SNP について検索してタイピングを行うことにした。また、その対照（日本人のバックグラウンド）として健常人についてその血液由来の不死化細胞から得た DNA を用いて検討した。それぞれの結果を比較することによって人工心臓弁を体に埋植した際の血栓やパンヌスの形成の原因となる遺伝子多型を探索していく。

9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

人工関節置換術は国内で年間約 10 万例が行われており、広く普及した治療法と言える。それに伴い、人工関節の再置換例も増加している。

再置換術は患者にとって大きな負担となる。再置換術は初回の手術に比べ困難な手術となり、成功率も低下すると言われている。従って、再置換の原因を分析し、再置換の必要のないインプラントの開発が急務となつて

いる。

人工関節の再置換の原因として、摺動面に使用される超高分子量ポリエチレン（Ultra-high molecular weight polyethylene、以下、「UHMWPE」とする）部品の耐久性が問題になることが多い。例えば、人工膝関節におけるデラミネーション破壊と呼ばれる疲労破壊、近年では、PS タイプと呼ばれる人工膝関節の疲労破壊が懸念されている。

一方、人工股関節の場合、従来、摩耗粉の発生に起因するゆるみが最大の問題として研究が行われてきた。これらの研究の過程で、滅菌のために行われるガンマ線照射によりUHMWPE 内部に発生したフリーラジカルが長年にわたる酸化劣化の原因になること、酸化劣化により摩耗量が大幅に増大すること、引張特性などの機械的性質も低下することなどがわかってきた。そこで現在では、空気中におけるガンマ線照射は行われなくなり、不活性ガスを充填した密封包装を使用するなどの酸素非存在下でガンマ線照射を行うなどの対策を行っている。しかし、UHMWPE 内部に発生したフリーラジカルが除去されるわけではないので、長期の埋植期間中に酸化劣化が進行する可能性も否定できない。

また、1990年代後半より摩耗と摩耗粉の発生を抑制するため、架橋ポリエチレン（Highly cross-linked polyethylene、以下「HXLPE」とする）と呼ばれる材料が開発され、市場に投入されたが、機械的強度が低下することが、問題点として指摘されている。

このように、人工膝関節、人工股関節の両分野においてUHMWPEの疲労特性の評価の重要性が高まっているが、人工関節用UHMWPEは金属材料に比べて、破断伸びが大きく、粘弾性の特徴を示すなど、金属材料を対象とした疲労試験をそのまま適用することは困難である。また、製品の分析や抜去品の分析な

ど、小試験片での試験が行えることが望ましく、既存の規格や従来の試験法の枠にとられない新しい試験方法が必要である。

10. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発

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

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

DBTの主な毒性として、免疫毒性が挙げられ、胸腺に対する毒性が指摘されてきた（荒川、2000、Comment et al., 1992、Whalen et al., 2001）。これまでに、DBTの低濃度曝露での胸腺リンパ球に対する傷害が報告されている。DBTは、極性が比較的高く、血液脳関門への透過性は低い（荒川、2000、和田、1985）ため、その神経毒性の評価は行われてこなかった。しかし、人工硬膜が生体吸収性であるため、臨床使用の際には人工硬膜内に含まれているDBTは脳内に溶解出し、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、比較的低濃度での DBT、OT の細胞増殖への影響をマウスのアストロサイト系細胞を用いて評価した。アストロサイト系細胞を用いた DBT、OT、各種 PLLA の神経毒性の評価方法を確立することが本研究の目的である。

11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

現在、脊椎の整形外科的治療法において、スクリューネジを用いた様々な固定器具が用いられており、これらの力学的安定性は ASTM, ISO などで定められた実験的手法によって評価されている。しかし、こうした実験的手法は時間とコストがかかるだけでなく、統計的誤差も大きい。そこで本研究では、有限要素法を利用した数値シミュレーションによって、脊椎固定器具の力学的安定性を評価する新しい技術の開発を目的とする。

12. 軟骨修復のヒト臨床使用類似モデルによる有効性・安全性評価手法の開発

関節軟骨は関節で相対する骨の表面を覆い、衝撃吸収と摩擦低下の役割を果たしている。近年の報告では、関節鏡時の関節軟骨損傷の頻度が数%におよび、これまで思われていたより高頻度であることが明らかになってきた。

関節軟骨は自己修復能力が乏しい組織であるため、いったん損傷されると、関節軟骨の本来の組織である硝子軟骨で修復されることがない。線維組織あるいは線維軟骨で修復された場合、生体力学的に異なるために将来的には変形性関節症に進行すると考えられている。

損傷された関節軟骨を修復する方法は長年にわたって無かったが、約半世紀前から骨髄刺激法が行われるようになった。軟骨欠損部の軟骨下骨に穴を開け、骨髄から出血させ、前駆細胞と成長因子を供給しようとする方法である。この方法により関節軟骨欠損の修復は促進されるが、それでも線維軟骨であると考えられている。線維軟骨による修復では不十分で硝子軟骨でないとダメかという点、必ずしもコンセンサスを得ていない。前述のように関節軟骨欠損の症状は出にくいために、線維軟骨による修復でも、症状の違いは出にくい。短期的経過では臨床的には大きな問題ではないとの意見も多く、骨髄刺激法は今でも世界中で広く行われている。

近年になり、組織細胞工学を利用した細胞移植による関節軟骨欠損修復法が開発され、欧米では1万例に自己軟骨細胞移植が行われた。しかしこの治療法が確固たる地位を得ているわけではなく、その有用性については未だに論争中で結論は出ていない。

新しい関節軟骨の治療方法が受け入れられるためには、これまでである骨髄刺激法より有効であることを証明する必要がある。手術

適応が不明確であること、および評価方法が確立されていないことがその原因であると考えられ、それらの確立が急がれる。

ヒトに対しては侵襲の大きな検査は施行できないために、ヒトと同じ手術を施行し、同じ検査を可能であり、しかも最終的には組織を採取できる実験モデル動物の開発が重要である。

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

B. 研究方法

1. 感染因子含有材料の in vivo 動態評価手法の開発

医用材料には、日本ハム製コラーゲン及び東芝セラミックス製ハイドロキシアパタイト (HA) を使用し、コラーゲン 1 mg 当たり $10^0 \sim 10^5$ EU 相当の大腸菌 03 株精製 LPS 又は $10^0 \sim 10^4$ EU 相当の大腸菌 0111 株乾燥菌体を添加したコラーゲンシート及びコラーゲン/HA シート (3:5) を作製した。同様に黄色ブドウ球菌 209P 株乾燥菌体を 0.01 -10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の濃度範囲で添加したコラーゲンシートも

作製した。各シートの表面構造は JEOL JSM-5800LV 走査型電子顕微鏡を用いて観察した。エンドトキシン試験は、精製コラゲナーゼ/塩酸抽出法、塩酸抽出法及びガイドライン法により試料を調製した後、カイネティック比色法に準じて実施した。

ラット埋植試験には7週齢のFischer系雄ラットを使用し、背部皮下と腹腔内に試料を埋植又は1cm角で真皮層に至る深度で作製した創傷皮膚に被覆して、術後1週及び2週目における生体影響を病理組織学的に評価した。骨再生実験では大腿骨及び頭蓋骨にそれぞれ直径1mm又は5x5mm角の大きさで作製した欠損部に材料を埋植し、2週及び4週後の病理所見を軟X線解析及びHE染色により観察した。頭蓋骨窩洞部分に形成された新生骨の濃度と総面積はアルミステップウェッジと共に撮影した軟X線像から画像解析ソフトWinRoofを用いて計算した。

18-mer LLKKK アナログ (K¹⁵LF KRI VKR ILK FLR KLV³²) は、ペプチド合成機を使用して、Fmoc基を用いる固相法により合成した。8種のゼラチンハイドロゲルからの18-mer LLKKK アナログ徐放試験はQTRAP 4000 Proを用いたMRM分析 (ESI positive mode: Q1=469.0, Q3=84.2: HPLC column, Shodex RSpak DE-213) により行った。In vitro 抗菌試験はNCCLS M7-A5の変法に準じて行った。菌株としては、黄色ブドウ球菌209P株及び緑膿菌の2種を使用し、抗菌剤としては、18-mer LLKKK アナログ、ポリミキシンB、ストレプトマイシン、ペニシリンGの4種を使用した。ラット背部皮下におけるin vivo 抗菌試験では菌株及び抗菌剤担体としてコラーゲンシート及び酸処理ゼラチンシートを使用した。

細胞毒性試験及び染色体異常試験は、それぞれV79細胞(5%FCS-GMNP倍地)及びCHL細胞(10%FCS-MEM倍地)を用いて、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従っ

た。ヒト単球系ライン化細胞MM6-CA8株に対するIL-6産生誘導能はELISAキットを用いる常法により測定した。本実験で使用したガラス製、金属製、テフロン製器具は使用前に250°Cで2時間加熱処理を行った。また、プラスチック製器具はパイロジェンフリーの製品を使用した。

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

1) 乾熱滅菌

乾熱滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 芽胞に乾熱滅菌処理後異なる培地メーカーで同一培地であるSoybean Casein Digest Agar (SCDA)培地で培養させ、各培地の培地性能の違いに拠って生育菌数に差が生ずるか否かについて検討した。BIを乾熱滅菌器にて暴露させ生残菌を回収後、SCDA培地にて生残菌数を測定した。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。

2) 高圧蒸気滅菌

高圧蒸気滅菌用BIである*Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 芽胞に高圧蒸気滅菌で暴露後6種の培地メーカーで同一培地であるSoybean Casein Digest Agar (SCDA)培地で培養させ、各培地の培地性能の違いに拠って生育菌数に差が生ずるか否かについて検討した。BIを高圧蒸気滅菌器にて暴露させ、生残菌を回収後、SCDA培地にて生残菌数を測定した。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。

3) EOG 滅菌

EOG 滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 芽胞にEOG暴露後3種の培地メーカーのSoybean Casein Digest Agar (SCDA)培地で培養させ、各

培地メーカーの培地性能の違いに拠って生育菌数に差が生ずるか否かについて検討した。EOG 滅菌で損傷した BI 菌に種々の損傷回復剤を添加し、どの薬剤が損傷回復に有効に作用するかについて検討した。

4) ガンマ線滅菌

ガンマ線滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus pumilus* 芽胞ならびに *Bacillus megaterium* 芽胞にガンマ線照射し、損傷菌を得た。*Bacillus megaterium* 芽胞はヨルダーを示すため、同じ損傷菌で、シヨルダーの有無での損傷回復剤の違いの有無についても検討した。損傷菌は SCDA 培地で培養させた。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。

5) 電子線滅菌

電子線滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus megaterium* 芽胞に電子線照射させ、損傷菌を得、損傷菌は SCDA 培地で培養させた。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。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

1) 医療機器の抽出

試料の表面積 6 cm² 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、必要に応じて 3500 rpm で 10 分間遠心した。

2) LLNA

BALB/c または CBA/J 系雌性マウス (1 群 3 ~ 4 匹) の両耳裏側に試験溶液を 25 μ l ずつ 3 日間連続塗布した (Day 1, 2, 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 μ l ずつ両耳に塗布した。リン

パ節細胞 (lymph node cell, LNC) の BrdU 取り込み量を測定する場合は、解剖の 24 時間または 3 時間前に BrdU 溶液 500 μ l をマウスの腹腔内に注射した。Day 6 または Day 7 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、リン酸緩衝液 (PBS) を加えて押しつぶして LNC を遊離させ、細胞数を数えた。

3. リンパ節細胞の反応性の測定

希釈した細胞浮遊液について、細胞内 ATP 量を市販 ATP 測定キットとルミノメーターを用いて 10 秒間の発光量 (RLU) から求めた。細胞の BrdU 取り込み量は、LNC を 96 穴プレートの各穴に入れて遠心後、市販 ELISA 測定キットに従って操作し、TMB 基質溶液を加えて発色させ、プレートリーダーで吸光度を測定した。almarBlue 取り込み量は LNC を 96 穴プレートの各穴に入れた後、alamarBlue を 10 μ l 加えて 3 時間培養後、プレートリーダーで蛍光強度を測定した。³H -thymidine incorporation (³HTdR) 取り込み量は LNC 浮遊液に ³HTdR を添加して 3 時間培養した後、細胞を回収して液体シンチレーションカウンターにより放射活性 (dpm) を測定した。各指標とも、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。

4. フローサイトメトリー分析

LNC に FITC または PE 標識した各抗マウスモノクローナル抗体 (CD3, CD4, CD8, CD19 または CD45R/B220) を添加し、氷上で遮光下 30 分間インキュベートして細胞を染色、洗浄、固定後、フローサイトメーターを用いて 10000 個の細胞を測定した

5. In vitro 感作性試験

THP-1 細胞は FBS 10 % 及び 2-mercaptoethanol 55 μ mol/l を含有した RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) で培養した。各試験物質の細胞毒性試験を行い IC50 (μ g/ml)

を決定した。24 穴プレートで細胞を 24 時間培養し、試験物質を IC50 の 0.1 倍、0.5 倍、1 倍及び 2 倍の計 4 段階になるように入れて更に 24 時間培養した。FITC 標識抗 CD86 抗体、抗 CD54 抗体またはマウス IgG1, κ で染色後、フローサイトメーターを用いて細胞 10000 個の CD54 及び CD86 発現量を平均蛍光強度として求めた。

6. 即時型アレルギー性の評価

生理食塩水で調製した試験溶液を alum 溶液とともに 1 週間に 1 回、合計 3 回マウスの腹腔内に注射し、最終投与から 7 日後、採血した。血清中の総 IgE 及び IgG 抗体価 ($\mu\text{g/ml}$) の測定は市販測定試薬を用い、得られた吸光度を検量線と比較して求めた。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

JIS や ISO、及び米国の ASTM に掲載されている、金属・合金に関する試験法を調べた。FDA の不具合情報収集システムから、ファイルをダウンロードして、独自のデータベースを作成した。機器のクラス分類、報告年の情報を付加し年別推移分析が可能なようにした。同時に埋植機器を抽出した。分野別、クラス別、健康被害の有無の集計も行って全体像を掴んだ。また、Ni、Ti のアレルギー関連報告を整理した。一方、以前の整形外科インプラントの不具合報告から、金属材料を使用した機器の破損、摩耗、ゆるみに関するものを抽出し、再整理した。厚生労働省に報告された不具合報告の中で、整形外科インプラントを整理すると共に、回収情報や安全性情報で、金属・合金に関するものを調査した。さらに、全不具合報告を機器の種類別に整理した。

動物埋植用に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、14mm ϕ の円形板(厚さ 1mm)を選択した。なお、比較のために、純 Ni 円板、純 Ti 円板も製造した。

また、対照合金として Ti-6Al-4V 合金製の円板も用いた。動物は Fisher 系ラット雌で 1 群 5 匹とした。

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。4 週、8 週、16 週経過後に、エーテル麻酔で致死後、皮下への埋植材は周囲組織と共に摘出し、ホルマリン固定した。また、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 HE 染色を施して病理組織学的に検索した。また、埋植材料と同じ円板(Ti/Ni, Ni, Ti-6Al-4V)を、溶出試験に供した。

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 合金として、Ti-6Al-4V、Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo、Ti-15Mo-5Zr-3Al、Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb を用いた。また、純金属として、Ti、Zr、Nb、Al を用いた。

In vitro 用試料は直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円板状、in vivo 用試料は直径 1.0 mm、長さ 7.0 mm のロッド状とした。試料は、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄した後、乾熱滅菌または高圧蒸気滅菌した。

2) 細胞毒性試験

試料の細胞毒性は、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、抽出法によるコロニー法および直接接触法によるコロニー法を用いて試験した。

3) 細胞適合性試験

試料の上で正常ヒト骨芽細胞 NH0st を培養し、細胞の増殖および分化を指標として、試料の骨芽細胞適合性を評価した。すなわち、24 ウェルマルチプレートのウェルに置いた試料の上に培地 1 ml に懸濁させた 10,000 個の NH0st 細胞を播種し、2 週間静置培養した。細胞増殖の指標として、生細胞測定用試薬

TetraColor ONE を用いて細胞数を測定した。細胞分化の指標として、ALP 活性およびCa 量を測定した。ALP 活性は、パラニトロフェニルリン酸を基質として、パラニトロフェノールの生成量として測定した。また、Ca 量は、塩酸抽出した後、カルシウムC-テストワコーを用いて測定した。

4) ラット大腿骨埋植試験

フィッシャー系雄ラット（7 週齢）を麻酔下で腹位に固定し、大腿部皮膚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 1.0 mm の窩洞を形成し、窩洞部へ試料を挿入した。試料埋植後 1, 2 および 4 週で動物を屠殺し、大腿骨を採取して固定した後、軟 X 線撮影した。その後、大腿骨を脱灰し、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、試料埋植後 4 週の大腿骨を採取して固定した後、大腿骨に埋植した試料の引抜強度を測定した。

5) 計学的検定

JSTAT Version 10.0 を用いて、一元配置分散分析および Tukey-Kramer 法による多重比較を行った。有意水準は危険率 5% 未満とした。

6. ステンント用合金の力学的・耐食性・血液適合性評価手法の開発

耐食性の評価は、二つの方法で行った。詳細は各年度の報告書に詳しいが、ここでは概略を説明する。

第一の方法は溶出試験で、0.9%NaCl 水溶液中、ならびに 1.0%乳酸溶液中に所定期間浸漬した試料からのイオン溶出量を誘導プラズマ発光分光分析（ICP）で評価した。ステンント用合金である Ti-Ni 合金の耐食性評価を行うとともに、各種比較材の結果と比較した。また、レーザー溶接を行った Ti-Ni 合金の溶出試験も同様にを行い、レーザー溶接部の耐食性評価を行った。

耐食性評価のための第二の方法はアノード分極試験である。これは作用極とした試料と対極（Pt などの金属）溶液中に浸漬し、両極間に電位を与えたときに流れる電流を記録する試験である。実際には安定な電位を記録するため、電位差は標準電極と作用極間に印加し、作用極—対極間の電流密度を記録する。合金表面の保護的な皮膜が有効に作用しているときは、電位を増加させても電流密度は増加しない。この状態を不動態といい、このときの電流密度（不動態保持電流密度）が小さい合金の方が優れた耐食性を有しているということが出来る。

一部の試料に関しては、アノード分極試験後（試験を途中で中断したものも含む）の試料の表面を走査型電子顕微鏡（SEM）観察し、表面状態を X 線光電子分光分析（XPS）で分析した。

ステンント用 Ti-Ni 合金の生体適合性を評価するため、擬似体液（1.5SBF, pH 7.4）に浸漬した合金表面へのアパタイト形成をエネルギー分散型 X 線分光分析装置を搭載した走査型電子顕微鏡（SEM/EDX）で分析、評価した。

最後に、新しいステンント用合金の候補として、Au-Pd 系合金に着目し、熱処理後の力学的性質の評価、耐食性の評価、血液適合性の評価を行った。力学的性質は主に引張試験と硬さ測定により、耐食性の評価は上述の二方法で、血液適合性評価は多血小板血漿を用いた血小板粘着試験で行った。

（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、藤田保健衛生大学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検討した。

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 斉: 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。

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

1. 健康人(日本人のバックグラウンド)の血液由来DNA

PSC(ファルマ スニップ コンソーシアム)によって樹立されたPSC細胞株から調製されたDNAを100検体用いて実験を行った。用いた検体の由来は、男性50名(平均年齢52.3±8.1才)女性50名(平均年齢52.4±8.1才)で、それぞれ40代20名、50代20名、60代10名であった。

2. 患者の血液由来DNA

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

3. SNP Typing

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 11 遺伝子の 29SNP についてタイピングを行った。

タイピングは、まず PCR を行ってターゲットの SNP を挟む 200~400bp 程度を増幅させ、得られた PCR 産物を Template として、各アレル特異的 Primer を用いて Typing PCR を行った。

9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

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。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。サンプル B はエチレンオキシドガス (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。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、サンプル H とした。

ASTM に規格化された二つの方法を用い加速酸化を行った。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。

加速酸化後のサンプルからおよそ 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により酸化度を測定した。

疲労試験は引張疲労試験、CCT 試験、ECT 試験の三種類の方法で行った。引張疲労試験はダンベル状の試験片を使用し、最大荷重 360N (平均応力 20MPa) の繰り返し荷重を加え、300 万サイクルまで行った。CCT 試験は、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、荷重 320N (平均応力 10MPa) の繰り返し荷重を加えた。ECT 試験では、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) を使用し、最大荷重 40N (平均応力 1.25MPa) から 480N (平均応力 15MPa) 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と電子顕微鏡により破断面の観察を行った。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、 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。