

3) 培養条件

37°C、5%CO₂の条件下で、10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT) 入り Dulbecco' s Modified Eagle Medium (Invitrogen, Grand Island, NY) にペニシリン (明治製菓、東京) を 75U/ml、ストレプトマイシン (明治製菓) を 75 μg/ml となるように調製したものを培養液として培養した。細胞生存率に関しては 24well の plate に各 2.5×10⁵cells/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、2.0 μM となるように添加した。さらに、DBT に関しては、最終濃度を 0、0.125、0.25、0.5 μM とする低濃度曝露についても検討した。OT については、エタノールに溶かした曝露用の原液を、最終濃度 0、25、50、75、100 μM となるように添加した。DBT、OT 共に培養液中のエタノールの最終濃度は、0.1%とした。

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

細胞生存の評価は、トリパンプルー色素排除法、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、トリパンプルー色素排除法を用いて細胞の生存率を検討した。

4)-2. 上清中グルタミン酸濃度

DBT についてはエタノールに溶かし、0.25 μM を最終濃度とし、曝露を行った。OT についてはエタノールに溶かし、100 μM を最終濃度とし、曝露用の原液として使用した。培養液中のエタノールの最終濃度は、DBT、OT 共に細胞の生存評価と同様 0.1%とした。PLLA5000、PLLA3000、人工硬膜用 PLLA オリゴマー各種については、DMSO 懸濁液を作製し、50 μg/ml を最終濃度として使用した。また、S3 については DMSO に溶かし、5 μg/ml を最終濃度とした。DMSO の培養液中の最終濃度も、細胞の生存評価と同様に 0.5%とした。

グルタミン酸産生の評価は、Aoyagi and Takahashi (2001) の方法に基づいて、グルタミン酸の放出量を、細胞上清中の濃度として定量した。DBT、S3 に関しては、曝露直後、1 時間、2 時間の時点、OT、PLLA5000、PLLA3000、ゲル層または弾性形状維持層 PLLA オリゴマーに関しては、曝露直後、3 時間、6 時間経過した時点で、予め 37°Cに暖めておいた Dulbecco' s phosphate buffered saline (以下 PBS、Sigma、St.Louis、MO) で、1 分間を 5 回、最初の 2 回は培養液よりも多い量で洗い、後の 3 回は 1ml で洗った。最後に PBS を 1ml 加え 3 分間静置し、上清を採取して測定試料とした。試料採取の前後で細胞数が減少していないことを光学顕微鏡により確認し

た。採取した試料をコスモナイスフィルター W (0.45 μ m) (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:tetrahydrofuran=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モン量を指標に分光光度計を用い、450nm の波長で測定した。また、光学顕微鏡による形態観察で細胞の増殖率を比較し、トリパンブルー色素排除法で生存率を評価することで細胞が弱ったために増殖抑制が起きたのではないことを同時に確認した。

5) 統計解析

細胞生存率評価、DBT の細胞増殖への影響に関しては、群毎に平均値を算出、LDH につ

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

11. 脊椎固定器具の力学的安全性評価手法の開発

有限要素解析を利用して、脊椎固定器具の力学的安定性について評価した。脊椎固定器具は堆体の動きを固定する器具であり、固定アームとスクリューネジから構成される。有限要素解析法において有効な解析結果を得るためには、有限要素モデルの妥当性が重要となる。本研究では、ASTM F543-02 におけるスクリューの引抜試験および ASTM F1717-04 における脊椎固定器具の圧縮荷重試験による実験結果と有限要素解析による結果を比較し、モデルの妥当性を検証した。脊椎固定器具では、スクリューネジの固定性が力学的安定性に影響を及ぼすため、スクリューネジを椎体に正確に挿入するためのガイドホールが設けられる。本研究では、このガイドホールがスクリューネジの強度に及ぼす影響について評価した。次に、評価妥当性を検証したモデルを用いて、長期間の力学的安定性 (疲労寿命) を評価するために、有限要素解析法を利用した疲労寿命推定シミュレーションを行った。

骨内に固定されたスクリューネジを一定荷重で引き抜くときの引抜強度と、その際に皮質骨・海面骨に発生する応力状態を調べた。スクリューネジは一般的に市販されているタイプをモデル化し、ガイドホールの有無による二つのモデルを作成した。骨モデルは単純円筒形とし、長軸方向にスクリューを挿入

するものとした(図 1)。有限要素モデルの要素は8 節点 SOLID とし、骨とスクリュー界面には摩擦(摩擦係数 $\mu=0.3\sim 0.6$) を考慮した非線形接触要素を導入した。荷重条件として、ASTM F543-02 に従い、1mm/min の速さで円筒骨の長軸方向に沿ってスクリューを引き抜くものとした。拘束条件として、円筒骨モデル底辺部を全方位固定とした。

次に、ASTM F1717-04 に基づき、脊椎に器具を装着した場合を想定した力学安定性を評価した。実験モデルは左右対称であるため、有限要素モデルは実験モデルの半分をモデル化した(図 2)。

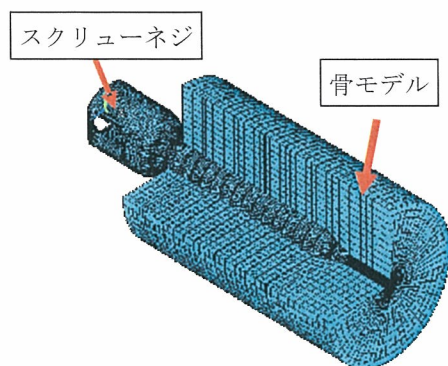


図1 スクリューネジ - 骨モデル

表 1 有限要素モデルの材料物性値		
部材	E (MP)	ポアソン比
スクリューネジ	114,000	0.3
円筒骨	137.5	0.3
UHMWPE	700~1000	0.3

スクリューネジと UHMWPE (超高分子量ポリエチレン) 間の摩擦係数、スクリューネジの材質、荷重の大きさをパラメータとして、圧縮荷重による鉛直方向への変位を比較した。スクリューネジと UHMWPE ブロック界面に摩擦

(摩擦係数 $\mu=0.3\sim 0.6$) を考慮した非線形要素を導入した。荷重条件として、上側 UHMWPE ブロックの上面から Z 軸下向きの荷重を与えた。荷重は実験 (100N, 200N) の半分の荷重 (50N, 100N) とした。拘束条件として、上側 UHMWPE ブロックの X-Y 方向と、下側 UHMWPE

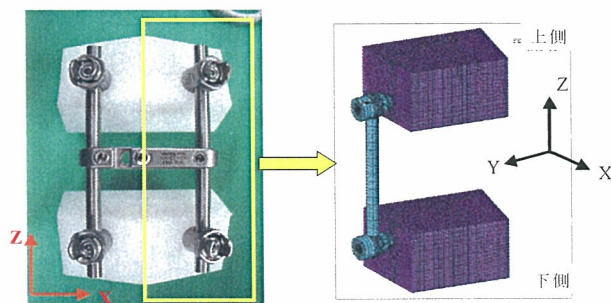


図2. 脊椎固定器具(左)と有限要素モデル(右) スクリューネジ挿入モデル

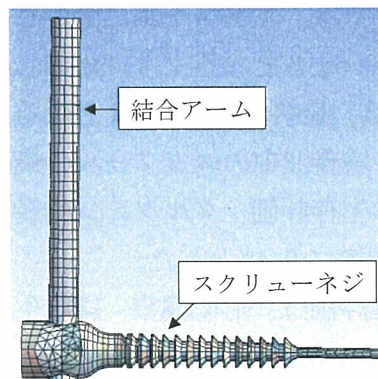


図3. シミュレーションモデル

ブロックの X-Y-Z 方向を全方位固定とした。モデルに用いた材料特性を Table. 1 に示す。全ての数値計算には汎用有限要素解析プログラム ANSYS10.0 を使用した。

固定器具の長期力学的安定性を評価するために、疲労寿命推定シミュレーションを行った。スクリューネジと UHMWPE 界面の摩擦に影響されないように、Model-A としてスクリューネジのみ、及び Model-B としてスクリューネジと結合アームを組み合わせた場合をモデル化してシミュレーションを行った。図 3 に疲労強度推定シミュレーションモデ

ルを示す。

Mode-A ではネジの端点二箇所を支持固定し、ネジ部中央に荷重をかける三点曲げ荷重式による疲労強度を計算した。次に、Model-Bでは、スクリューネジ部分を全方位拘束し、アーム断面に荷重をかけて、実験よりも大きな荷重状態のシミュレーションを行った。荷重は両モデルとも 100~500 [N]とした。モデルの材質はTi-15Mo-5Zr-3Alとした。材料の疲労強度特性を図4に示す。

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

生後約12ヶ月、体重約30kgのオスのミニブタ16頭で実験をおこなった。

ミニブタからの骨髓血の採取、細胞増殖、多孔質担体への播種、移植手術方法は簡単に以下に示す。

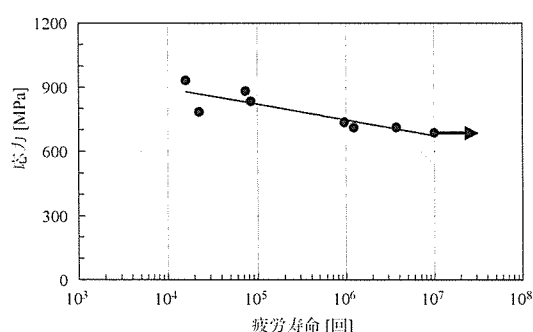


図4. Ti-15Mo-5Zr-3Alの疲労強度特性

【ミニブタ骨髓間葉系細胞の採取】

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

【多孔質担体への細胞の播種】

まず多孔質体に生食をしみこませ、ろ紙に

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

細胞濃度は 5×10^6 個/mlであった。

【ミニブタへの移植手術】

全身麻酔下、ミニブタの膝関節を傍膝蓋内側切開で展開し、大腿骨膝蓋骨溝に、直径12mm、深さ3mmの骨軟骨欠損を作成した。

コントロール群は欠損部を放置、担体としてSZを作成し、それぞれ細胞の無い担体のみ、あるいは担体に自己骨髓細胞を入れたものを移植した。

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

C. 研究結果

1. 感染因子含有材料のin vivo 動態評価手法の開発

(1) 皮膚創傷被覆試験

種々の量の大腸菌乾燥菌体を含むコラーゲンシートを皮膚創傷部に被覆し、術後1週及び2週目の生体影響を病理学的に診断した。術後1週目の所見において、対照群及び種々の量の大腸菌死菌体を含有するコラーゲンシートを被覆した実験群の全例ともに、被覆したシートは滲出液の浸漬によって皮膚創傷面に接着していた。また、創面からの著しい好中球浸潤が観察され、創面側のコラーゲン線維は融解・消失を生じていた。被覆材下は軽度の炎症細胞の浸潤を伴う線維の増生を示す肉芽組織から構成され、創傷部位辺縁では上皮の再生が観察された。対照群と実験群において病理組織学的相違は認められなかった。術後2週目の所見において、対照群と実験群ともに切除部は薄い重層扁平上皮により被覆されており、上皮下は膠原線維の増生が認められた。

(2) 皮下埋植試験

種々の量の大腸菌乾燥菌体及び黄色ブドウ

ウ球菌乾燥菌体を含むコラーゲンシートをラット背部皮下に埋植し、術後1週及び2週目の生体影響を病理学的に診断した。皮下埋植後1週目の所見において、対照群及び比較的少量の大腸菌死菌体を添加したコラーゲンシートは、ひ薄な線維性結合組織に被包されており、散在的に線維芽細胞と毛細血管の侵入が認められた。僅かにリンパ球の浸潤が認められたが、特筆すべき炎症所見は観察されなかった。しかし、精製コラゲナーゼ/塩酸法適用時の実測値として433.8 EU/mg (NOEL 値) を越えるLPS活性を示す大腸菌死菌体含有コラーゲンシートを埋植した実験群では、菌体添加量に応じて、軽度の好中球浸潤を認める所見(実測値1162.8 EU/mg)、好中球浸潤を伴う水腫性変化を示す所見(実測値3100.9 EU/mg)、高度の好中球浸潤を伴う線維化を示す炎症性肉芽で被包された所見(実測値35722.7 EU/mg)が観察された。

(表2)。皮下埋植後2週目の所見において、対照群及び比較的少量の同菌体を添加したコラーゲンシートでは毛細血管の侵入と線維芽細胞の増加が観察され、各シート内へのリンパ球の浸潤は極僅かであり、炎症所見は認められなかった。しかし、上記のNOELを越えるLPS活性を示すコラーゲンシートでは、埋植したシート周辺に多数のマクロファージの浸潤が認められ、コラーゲン線維の変性を示す所見が観察された。また、皮下におけ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ることが確認された。

(3) 腹腔内埋植試験

種々の量の大腸菌乾燥菌体を含むコラーゲンシートを肝被膜表面に埋植し、術後1週目の生体影響を病理学的に診断した。精製コラゲナーゼ/塩酸抽出法を適用した際の実測値として、4.7及び9.6 EU/mgのリムルス活性を示すコラーゲンシートを埋植した実

験群の病理所見は対照群と同様であり、埋植したシートは肝被膜と線維性結合組織によって癒着しており、その隣接部に少数の毛細血管及び線維芽細胞の侵入と軽度のリンパ球浸潤が観察された。実測値33.6 EU/mgのシートを埋植した実験群の病理所見は先の2群とほぼ同様であったが、リンパ球浸潤が若干多く観察された。また、433.8及び1162.8 EU/mgの活性を示すシートを埋植した実験群の場合、シート内への毛細血管と線維芽細胞の侵入がやや増加し、リンパ球と少数の形質細胞浸潤が観察された。一方、3100.9及び35722.7 EU/mgの活性を示すシートを埋植した実験群には膿瘍形成が認められ、埋植シートはリンパ級、好中球及びマクロファージの浸潤を伴う慢性化膿性肉芽により肝表面に癒着した所見が観察された。(表2)

(4) 骨埋植試験

大腸菌乾燥菌体含有コラーゲン/HAシートを頭蓋骨欠損部に埋植した時の骨再生状況を解析した。術後4週目の所見において、材料を被覆しなかった実験群は、2週目所見と比較して、軟X線不透過性が増強されたが、透過性を呈する領域も広く観察された。対照コラーゲンシート、対照コラーゲン/HAシート及び少量の大腸菌乾燥菌体を含むコラーゲン/HAシートを埋植した各実験群では窩洞形成部のごく一部に透過像が認められたが、新生骨の軟X線不透過性は周囲骨と同程度にまで増強された。精製コラゲナーゼ/塩酸法適用時の実測値として15.4、104.0、1719 EU/mgのLPS活性を示すシートを埋植した実験群においても新生骨の形成に伴う軟X線不透過像が観察されたが、添加した菌体量に依存して強い軟X線透過性を示すことが確認された。また、実測値16935 EU/mgのシートを埋植した実験群の窩洞形成部は軟X線透過像を呈していた。新生骨形成に関する病理組織学的所見は軟X線解析の結果と相関していた。

大腸菌乾燥菌体含有コラーゲンシートを使用した大腿骨欠損部の埋植試験においても、頭蓋骨埋植試験とほぼ同様の用量依存性が認められたことから、試験の容易な頭蓋骨埋植試験により、新生骨形成に影響を与える菌体量を定量的に解析した。アルミステップウェッジによりコントラストを補正した軟X線解析像から頭蓋骨窩洞部分に形成された新生骨の濃度と総面積をWinRoofにより解析した結果、新生骨の骨濃度と骨総面積は菌体添加量に比例して減少する傾向が認められた。t検定の結果、対照群と比較して、実測値として9.6 EU/mg (NOAEL値)のLPS活性を示すコラーゲンシートを埋植した実験群は骨濃度、骨総面積ともに有意差が認められなかった。しかし、実測値33.6及び433.8 EU/mgのシートを埋植した実験群の骨濃度には有意差($p < 0.05$)が認められた。また、骨総面積についても、前者($p < 0.05$)及び後者($p < 0.01$)ともに有意差が認められた。病理組織学的診断においても、同様の所見が得られた。

黄色ブドウ球菌乾燥菌体添加シートを使用した頭蓋骨埋植試験では、1・g/mg実験群では対照群と同等の骨再生が認められた。また、10・g/mg実験群の場合、慢性炎症性細胞浸潤が観察されたが、4症例中3例に明瞭な骨形成が誘導されていた。

(5) 精製LPS含有材料の各種埋植試験 興味あることに、大腸菌由来の精製LPSを添加したコラーゲンシートを試料とした各種埋植試験における病理組織学的所見は、対照群と比較して大きな差異が認められなかった。この現象には、コラーゲンからのLPS遊離速度や活性を保持している生体内寿命などが関与しているものと思われるが、少なくとも医用材料に混在し得る量の遊離LPS自体は、正常な皮下及び腹腔のほか、創傷治療や骨再生に対して大きな影響を及ぼさないことが示

唆された。しかし、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た骨再生の顕著な遅延はLPSを持たない黄色ブドウ球菌死菌体含有コラーゲンシートでは起こらないことから、グラム陰性細菌の細胞外膜成分であるLPSが骨再生の過程において何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

(6) 徐放基材の開発と生体適合性評価

6-1. 徐放試験

8種類のゼラチンハイドロゲルに含浸させた18-mer LLKKKアナログの溶出挙動を検討した。エチレンジアミン化ゼラチンは18-mer LLKKKアナログの保持能力が弱く、含浸させた大部分の同アナログが30分以内に放出した。一方、スルホアセチル化ゼラチンとアルカリ処理ゼラチンは同アナログとの結合親和性が比較的高く、24時間までの放出率がそれぞれ72.2%と55.6%であった。コハク化ゼラチン、酸処理ゼラチン及びアルキル化ゼラチンでは、含浸させた同アナログの約半量が30分以内に放出されたが、24時間後でも5%前後の放出率が得られた。これら3種のゼラチン誘導体中、1時間以降の18-mer LLKKKアナログ放出量が最も高い材料は、最も高い含水率を示す酸処理ゼラチンであった。

6-2. 生体適合性試験

18-mer LLKKKアナログの徐放性に優れた酸処理ゼラチンの細胞毒性試験を行った結果、100%抽出液は僅かな細胞毒性(コロニー形成率17.6%)を示したが、 IC_{50} は82.5%であり、細胞毒性に関して大きな問題は認められなかった。また、同ゼラチンは染色体毒性も示さなかった。酸処理ゼラチンをメンブランフィルター濾過後にシート化し、ラット背部皮下埋植試験によって生体適合性を評価した結果、埋植後1週間目の病理所見において、埋植シートは線維性結合組織に被包されており、軽度のリンパ球浸潤が認められるほか、

結合組織に接する部位に変性が観察された。埋植後2週間目の所見では埋植材の吸収が進み、少量残存していたゼラチンシートは軽度のリンパ球浸潤を示す結合組織によって被包されており、大食細胞反応が観察された。

(7) CAP-18 類縁体の抗菌試験

7-1. in vitro 抗菌試験

黄色ブドウ球菌に対する 18-mer LLKKK アナログの 50%発育阻止濃度 (50% Inhibitory Concentration, IC_{50}) は $1.09 \mu M$ であり、グラム陽性菌に対して強い抗菌力を示すペニシリンGと比較すると劣るものの、ポリミキシンB、ストレプトマイシンと同等以上の抗菌活性を示した。各種の抗生物質に抵抗性を示す緑膿菌に対する同アナログの IC_{50} は $41.0 \mu M$ であり、ストレプトマイシンとほぼ同等の抗菌力を示した。一方、緑膿菌に対して高い抗菌活性を示すことが知られているポリミキシンBの IC_{50} は $4.6 \mu M$ であった。

7-2. in vivo 抗菌試験

緑膿菌非接種の陰性対照群からは生菌が回収されなかったが、抗菌剤を添加していない陽性対照群では平均値として約 6.5×10^6 個/ラットの生菌が回収された。緑膿菌に対して高い抗菌活性を示すことが知られているポリミキシンBは試験に供した濃度範囲 ($3.9-388 \mu M$) において顕著な活性を示した。一方、18-mer LLKKK アナログは $427.5 \mu M$ まで顕著な抗菌活性を示したが、 $42.8 \mu M$ 実験群では生菌の存在が認められ、約 1.2×10^5 個/ラットの生菌が回収された。 $42.8 \mu M$ 実験群の生菌回収率は1.9%であり、緑膿菌に対する 18-mer LLKKK アナログの in vivo 50%発育阻止濃度 (IC_{50}) 同濃度未満であることが確認された。抗菌剤を添加していない陽性対照群の病理所見ではコラーゲンシート全体に多数の好中球浸潤が認められた。 $1710 \mu M$ の 18-mer LLKKK アナログを含浸させた実験群の病理所見は陽性対照群と類似してい

たが、好中球浸潤は少ない傾向を示した。また、 $388 \mu M$ のポリミキシンB投与群における好中球浸潤は明らかに少ない所見を呈したが、ゼラチンシート辺縁に著しい好中球浸潤が観察された。

(8) CAP-18 類縁体の LPS 中和活性 $1 EU/ml$ の JPSE (日本薬局方標準エンドトキシン) が示すリムルス活性と MMG-CA8 細胞に対する IL- γ 産生誘導能は 18-mer LLKKK アナログにより効率良く阻害され、両活性を 50%阻害する同アナログの濃度 (IC_{50}) は、それぞれ 0.01 および $0.05 \mu g/ml$ であった。また、 $10 EU/ml$ の JPSE が示す活性も同様に効率良く抑制された共に、この抑制効果は1%血清存在下でインキュベーションを行った場合にも認められた。大腸菌 03 株 LPS が示すリムルス活性も 18-mer LLKKK アナログにより濃度依存的に顕著に抑制され、 $10,000 ng/ml$ ($275,000 EU/ml$ 相当) の同 LPS が示すリムルス活性に対する IC_{50} は $5.82 \mu g/ml$ であった。同アナログは大腸菌 0111 株乾燥菌体が示すリムルス活性も顕著に抑制し、 $30,000 ng/ml$ ($4,775 EU/ml$ 相当) の菌体に対する IC_{50} は $0.78 \mu g/ml$ であった。一方、 $10 ng/ml$ の大腸菌 03 株 LPS が示すリムルス活性に対するポリミキシンBの IC_{50} は $61.1 \mu g/ml$ であった。

2. 再現性のある滅菌バリデーショナル達成法に関する研究

1. 乾熱滅菌

健常菌の場合には培地メーカー間に顕著な生育性能の差が認められなかった。損傷菌の場合には培地メーカー間に拠る生育性能の差が認められた。グルコースを添加することで損傷回復菌数が増加し、同時に培地メーカー間の生育性能に有意差が無くなった。損傷した乾熱滅菌の BI に炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、カザミノ酸、パンビタンを添加した場合、炭酸カルシウムな

らびに乳酸カルシウムの場合に損傷回復が認められた。また L-アラニン添加の場合にも損傷回復効果が認められた。L-セリン、塩化マグネシウムを添加した場合、損傷回復は認められなかった。損傷した乾熱滅菌の BI に複合アミノ酸、ピルビン酸、リゾチームならびに ATP を添加した場合、複合アミノ酸、ピルビン酸添加には損傷回復効果が認められたが、リゾチーム、ATP 添加の場合には回復は認められなかった。

2. 高圧蒸気滅菌

健常菌では培地メーカー間に顕著な差が認められなかった。損傷菌の場合には培地メーカー間で生育性能の差が認められた。グルコースならびにピルビン酸を添加することで損傷回復した。乳酸カルシウム、ジピコリン酸、パンビタン、複合アミノ酸、リゾチーム、ATP、酵母エキス、可溶性でんぷんならびにカタラーゼを添加した場合、乳酸カルシウム、パンビタン、複合アミノ酸、可溶性でんぷん添加では損傷回復が認められたが、他の成分では損傷回復が認められなかった。

3. EOG 滅菌

EOG で損傷された *Bacillus atrophaeus* の場合、乳酸カルシウムとグルコースで損傷回復が認められた。しかしピルビン酸の添加では損傷回復効果は認められなかった。同様に L-Alanine, D-Alanine, Panvitan, Amino acids mixture についても顕著な損傷回復効果は認められなかった。

4. ガンマ線滅菌

Bacillus megaterium の場合、損傷回復剤として乳酸カルシウム、L-Alanine, D-Alanine、アミノ酸混合液、グルコースが有効に作用した。*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には損傷回復効果は認められなかった。

4. 電子線滅菌

電子線滅菌された *Bacillus megaterium* の場合、乳酸カルシウム、グルコース、D-alanine、アミノ酸混合液で損傷回復能が認められた。*Bacillus pumilis* の場合、グルコース、Panvitan、アミノ酸混合液添加で損傷回復が認められた。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

2,4,-Dinitrochlorobenzene (DNCB) を投与した場合、リンパ節重量は溶媒対照の 3.1 倍になり、細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量は 5 倍以上になった。 α -n-Hexyl cinnamaldehyde (HCA) の場合、リンパ節重量における SI 値は 2.2 で、他の測定指標では 3~4 となった。DBT を塗布したときの各指標はいずれもコントロールよりも増加し、即時型アレルギーも著しいリンパ節活性化反応を起こした。試験物質の塗布を通常の 3 回に加えて一定期間後再度行くとリンパ節活性化反応が著しく増加した。検討した指標のうちリンパ節細胞数、ATP 量及び alamarBlue 取り込み量の SI 値は、BrdU 取り込み量に比べると高い値を示した。

細胞表面抗原を蛍光染色し、フローサイトメーターによって T 細胞及びサブセット、B 細胞比率を求めた。感作性物質は B 細胞数を増加するが、刺激性物質との区別は困難であった。試験物質によってリンパ球サブセット比率に若干の変化が認められた。

医療機器の抽出に用いられる植物油(オリーブ油)はアセトン-オリーブ油混合液と比べて、塗布溶媒としての反応性に有意な差は

なかった。HCA を種々の溶媒で試験したところ、アセトン-オリーブ油(A00, 4:1)を溶媒としたときに最も SI 値が高くなった。生理食塩水の抽出液を塗布するため、界面活性剤、糊剤、及び有機溶媒を混合して塗布した。A00 を基準にすると、50%PG と 1% PL92 の SI 値は低いか同程度で、Tween 80 によるリンパ節活性化反応は認めなかった。CMC は水への溶解性が悪く、調製が困難であるばかりか、粘性の粒状となって塗布も困難であった。SLS 溶液、DMSO では他の溶媒に比べて高い値を示し、結果として試験群の SI 値は低くなった。紫外線吸収剤を前処理した後、塗布した感作性物質のリンパ節活性化反応に変化はなかった。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結果、リンパ節活性化反応は認めなかった。オボアルブミン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が起こった。BSA による増加は少なく、高濃度のウシ胎児血清(FBS)では抗体価が上昇した。コラーゲンを主としたタンパク製医療機器の生理食塩水抽出液については総 IgE 抗体価の増加は認められなかったが、ゼラチン製医療機器では抗体価の上昇を示す動物を認めた。

4. Ti-Ni 合金材料の安全性評価手法の開発

調査した JIS, ISO, ASTM における金属関連の規格、及び試験法を列挙した。

米国の不具合報告では、整形外科インプラントを材料の観点からみると、膝関節の不具合では、破損、ゆるみ、摩耗の3者共に、合金+UHMWPE(超高分子量ポリエチレン)併用タイプの比率が高くなっていった。股関節では、破損において、合金のみの倍以上に合金+UHMWPE に報告が多かった。接合材の機器分類別では、ねじ、プレートの破損報告が多かつ

た。埋植機器の不具合報告全体では、他を圧倒しているのが埋め込み型除細動器であった。ペースメーカー電極でtとペースメーカー自身の報告も多く、両者を合わせると除細動器をはるかに超えてしまう。薬物放出冠動脈ステントは、最近では、最も報告が多い機器である。整形外科領域では、全体的に膝関節の報告数が股関節よりも1.5倍多く、特に特定分類の報告数が目立つと共に、年々顕著に増加傾向にあった。骨接合材では、ねじ、プレートが最近では定常的に2百件以上の報告がある。不具合内容別では、破損については、PP製縫合糸と血管内カテーテル、そして骨ネジの3機器が最も多かった。ゆるみに関しては、人工膝関節、次いで股関節に、その報告が多いが、最近、漸増の傾向が顕著であった。Niアレルギー関連では、「人工膝関節」、「脊椎固定機器」、「骨接合材」、「ステント」、「縫合具」、「歯科矯正機器」、「カテーテル」、「ペースメーカー」、「生検マーカー」、「避妊器具」の事例が報告されている。Tiアレルギー関連例では、「ペースメーカー」、「埋植型注入ポンプ」、「動脈瘤クリップ」、「人工歯根」、「軟組織固定用アンカー」、「ステント」、「骨接合材」、「生検マーカー」の事例が報告されている。Ti/Ni合金では、市販商品名について検索してみたところ、アレルギー関連報告はなかった。

厚労省への不具合報告については、金属材料関連では破損や折損の報告が目立っている。回収報告の中で、金属関連は、金属疲労による破損、破損、破損による金属破片の体内残留などがあった。不具合報告全体では、埋植機器では最も報告数が多い眼内レンズは、特定モデルの集中報告が総数を押し上げている。人工股関節、骨接合用品、人工骨、人工膝関節などの整形外科分野の報告も多い。ペースメーカー、導線、除細動器などの心臓関連の機器は明らかな増加傾向を示して

いる。

埋植した合金材料では、Ni 埋植群では1週後から既に背部に膨隆が見られた。4週後には大きな固まりがあり、摘出物も厚さが1cmにも達する固まりとなっていた。一方、Ti/Ni合金、純Ti群、Ti-6Al-4V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。体重変化は、Ni群と他の群では差があった。臓器/体重比については、8週後の肝臓でNi群がやや他群に比べて小さかった。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。埋植後の組織変化では、純Ni群は、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む壁は、壊死層、肉芽組織層、線維化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むマクロファージが観察された。また、8週で、材料の無いものが1匹あった。Ni埋植8週後は、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。16週では、Ni埋植した5匹中4匹に埋植材料の消失がみられた。埋植材料の消失した1例において、暗赤色の色素沈着が皮下に認められ、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、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では、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。8、16週では、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合金では、埋植材料は、線維化した結合組織によって被包されており、8週では、炎症細胞浸潤も殆ど観察されなかった。16週では、Ti埋植群

とほぼ同様の組織所見が観察された。

Ti-6Al-4V合金では、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。しかし、1例では、壁内に好酸球の浸潤が観察された。8週では、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例認められた。16週では、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例認められた。

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の溶出は、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の溶出は認められなかった。また、Vの溶出も非常に微量であった。

5. Ti合金材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究

1. 各種Ti系金属材料の細胞毒性と骨芽細胞適合性

直接接触法によるコロニー法において、Ti-6Al-4Vのコロニー形成率は9%で、弱い細胞毒性が認められた。しかし、その他のTi系材料のコロニー形成率は、いずれも80%~90%程度で、細胞毒性は認められなかった。

試料の上で培養したNH0st細胞の増殖に及ぼす影響について、細胞数で比較すると、Ti-6Al-4V < CP-Ti < Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo < Ti-15Mo-5Zr-3Al < Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd = Ti-Zr < Ti-Zr-8Nb となった。また、分化に及ぼす影響について、ALP活性で比較すると、Ti-6Al-4V < CP-Ti < Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo < Ti-15Mo-5Zr-3Al =

Ti-15Zr-4Ta-4Nb-0.2Pd < Ti-Zr < Ti-Zr-8Nb
となった。

2. Ti-Zr 基合金の細胞毒性と骨芽細胞適合性

抽出法によるコロニー法において、一部の試料でコロニーサイズの小型化が観察されたものの、いずれの試料も IC_{50} は >100% となり、細胞毒性は無いが非常に弱いことが確認された。また、直接接触法によるコロニー法において、Ti-6Al-4V のコロニー形成率は 8% で弱い細胞毒性が認められたが、Ti-Zr 基合金のコロニー形成率は 97%~102% の範囲内で、Nb 含量にかかわらずいずれも細胞毒性は認められなかった。さらに、純金属の Ti、Zr、Nb のコロニー形成率は 98%~105% で、いずれも細胞毒性は認められなかった。しかし、Al のコロニー形成率は 74% で非常に弱い細胞毒性が認められた。

試料の上で培養した NH0st 細胞の増殖に及ぼす影響について、Ti-Zr 基合金の上で培養した時の細胞数は、Ti-6Al-4V と比べて、Nb 含量にかかわらずいずれも増加した。また、純金属では Al だけが、Ti-6Al-4V と比べて、細胞数が減少した。また、分化に及ぼす影響について、Ti-Zr 基合金の上で培養した時の ALP 活性および Ca 量は、Ti-6Al-4V と比べて、Nb 含量にかかわらずいずれも増加した。さらに、Ti-6Al-4V と比べて、Ti、Zr、Nb の上で培養した時の ALP 活性および Ca 量はいずれも増加したが、Al の上では ALP 活性および Ca 量はどちらも低下した。特に、Al における Ca 量の低下が顕著であった。

3. Ti-Zr 基合金の大腿骨埋植試験

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、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 週において骨髓腔の新生骨梁は減少が認められ、埋植後 4 週において骨髓腔の新

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。

埋植後 1 週における HE 染色像において、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。埋植後 2 週における HE 染色像において、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 週のものに比べて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。埋植後 4 週における HE 染色像において、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。骨髓腔に形成された新生骨梁について、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。

大腿骨に埋植した金属試料の引抜強度について、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、材料間に引抜強度の有意な差は認められなかった。

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

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。

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。比較材としたステンレス鋼も同様であった。

X線回折及びSEM観察により、Ti-Ni 合金ではSBF浸漬中で3日以内にその表面にHAを形成することが確認された。形成されたHAは浸漬期間を長くするにつれ徐々に成長し、いずれの試料表面上にも球状のHAが析出していることが確認された。また、攪拌1時間の洗浄条件で初期のHA形成能が高かったことから、前処理の違いがHAの析出能に影響を与えると考えられる。

本研究で新たに開発したAu-Pd系合金の力学的評価の結果、Au-Pd二元系合金ではPdの添加により、溶質濃度のおよそ0.3乗に比例した固溶強化が認められ、Au-Pd-Ag三元系合金化によって、強さと十分な延性の合金が得られることがわかった。

開発合金の耐食性に関しては、0.9%NaCl水溶液中での溶出試験とアノード分極試験により、既存の生体用合金であるTi-Ni超弾性合金やTi-6Al-4V合金よりも優れた耐食性を有していることを明らかにした。

また、血液適合性試験を行い、開発した二元系合金が優れた、従来材(Ti-Ni合金や316L型ステンレス鋼)と同様の優れた血液適合性を有していることを見いだした。

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。

症例1は、18歳女性。骨形成不全があり、これまでに髄内ワイヤーを右下腿、右大腿、左大腿に3回挿入された経験を持つ。これまでに金属のアクセサリーで接触皮膚炎を起こした既往歴を持つ。今回は、骨形成不全で小児期近医通院中。初診受診より2カ月前に創外固定器を使用したところ、1カ月後より患側下腿に痒みを伴う皮疹が出現し、治癒しないために精査目的で当科を受診した。初診時右下腿に激しい痒みを伴う滲出性紅斑を認める。金属アレルギーを疑い、パッチテストを行ったところ、水銀、コバルト、ゴム硬化剤であるジチオカルバメートおよびチメロサルに、アレルギー反応を示した。

ステンレスの下腿髄内ワイヤーを埋植した時期には皮膚障害はなく、ステンレスの創外固定ワイヤーを装着後重度の接触皮膚炎を生じた。症例1が使用していた創外固定と髄内ワイヤーともにニッケルが含まれていた。皮膚を貫通して使用される創外固定器が装着されてはじめて接触皮膚炎が発症した。さらにニッケルを含む髄内ワイヤーそのものは抜去することなく、創外固定が除去された後には、改善した。

症例2は46歳の女性。眼鏡フレームやアクセサリーで接触皮膚炎の既往がある。変形性股関節症のために当院整形外科において臼蓋回転骨切術が施行された1年後より手術部位が発赤しているのに気づき、整形外科より金属アレルギーについて精査を依頼された。背部中央に暗赤色の線状の紅斑がある。パッチテストの結果、ニッケル、パラジウムが陽性で、プラチナは疑陽性であった。インプラントの組成はクロムとコバルトであっ

た。その後、抜釘し症状は軽快した。大腿骨に埋植されていたのはクロムとコバルトの合金釘であるが、ニッケルが含有されている可能性は否定できない。

ニッケル陽性の他の1例はクロム・コバルト合金釘が大腿骨に埋植されていたが、これらには陰性であった。コバルトが陽性の1例はコバルト・クロム合金人工膝関節を埋植していたが、これを除去せずに症状が消失した。他の2例はインプラントに含まれない金属に陽性であった。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確実例は8例あり、いずれも、ニッケルかクロムに陽性であった。

(2) 金属パッチテスト試料の検討結果

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。

(3) 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

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は両者の発現量は低い結果であった。

(4) 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な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表にまとめた。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。人工心臓弁置換手術をかつて受けた患者由来のDNAを用いた検討は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 (表 3-1)、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。

(表 3)

9. 人工関節用 UHMWPE の疲労特性評価手法の開発

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が変化せず、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。

引張疲労試験では、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。CCT 試験では、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。

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。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

たサンプルでは疲労特性が大幅に低下していた。

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 5 (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 5 (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 μM 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 μM の DBT 曝露による生存率について、0.5 μM 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 μM 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

った(表4)。

図6(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5)。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7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5)。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7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8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10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11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

スクリューネジを長軸方向に1.3mm変位させたときのスクリューに生じる反力について、実験結果と有限要素解析結果を比較した結果をT表7に示す。有限要素解析結果における反力は実験結果に比べて12%低いですが、こ

これは実験結果の誤差範囲で、有限要素解析結果と実験結果は良く一致しており、モデルが妥当であると言える。

図12にスクリュー内の von Mises 応力分布と歪エネルギー分布状態を示す。スクリューの遠位端と中央部分の応力が高くなっていた。歪エネルギーも応力同様、スクリューの遠位端が最も高く、破損の危険性を示唆している。変位量分布は図12に示されるようにスクリューの遠位ほど少なく、ネック周りで最も大きな変位を示した。ガイドホールの有無による影響として、ガイドホールが有る場合の歪エネルギーが低く破損の危険性も低い、引抜反力も低下しており、安定性の低下が示唆された。

次に ASTM F1717-04 に基づく実験と比較した結果、荷重が 50N (実験の 100N に相当) の場合の変位は 1.46mm、荷重が 100N (実験の 200N に相当) の場合の変位は 3.16mm 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、有限要素モデルの妥当性が示された。

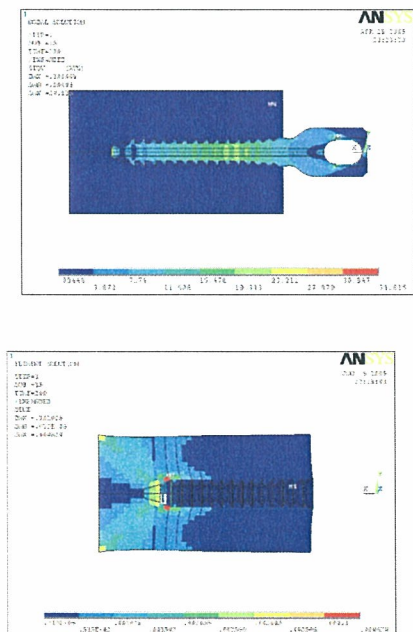


図12. 有限要素解析結果
(上) スクリューの von Mises 応力分布
(下) 歪エネルギー分布

疲労寿命推定シミュレーションの結果、スクリューネジのみの場合 (Model-A) と結合アームを組み合わせた場合 (Model-B) では疲労寿命が変化した。図13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 の場合に約 104 回まで低下した。一方、Model-B では、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、スクリューのみの場合よりも大きく、スクリューに大きな応力がかかるためである。

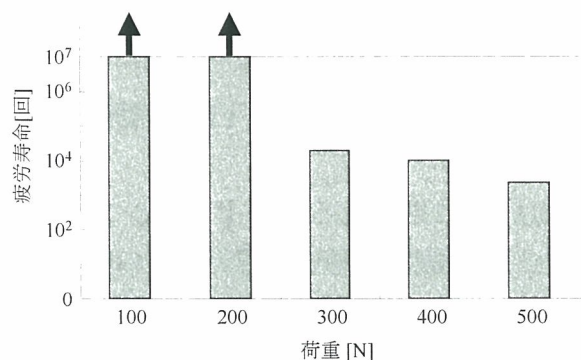


図13. 疲労寿命推定シミュレーション結果
(左) Model-A

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

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。

担体のみ充填群では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+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ヵ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

従来からある方法である 3DFLASH では修復組織を評価したところ、担体のみの充填群では表面が不整であったが、細胞+担体移植群では修復組織は表面が滑らかであった。

diffusion では、担体のみの充填群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。細胞+担体移植群では、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 LPS が循環血液中に入ると、発熱のほか、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 規格値を試算した結果を表 1 に示した。本研究では、回収率を最適化した精製コラーゲン/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。

CAP-18 は好中球に存在する分子量 18 kDa の塩基性の生体防御蛋白であり、ウサギ CAP-18 は 142 アミノ酸残基、ヒト CAP-18 は 140 アミノ酸残基から構成される。抗菌作用及び LPS 中和作用を示す活性ドメインはアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸とフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンなどの疎水性アミノ酸を含む C 末端側の 37 残基であり、活性を発現する最小単位は 18 残基ペプチドであることが明らかにされている。また、18 残基ペプチドの E22 と K31 をロイシンに、また Q28、D32 および N36 をリジンに置換した修飾ペプチド (18-mer LLKKK アナログ) が類縁ペプチドの中で最も強い抗菌活性と LPS 中和作用を示すことが判明していることから、本研究では、生体内での酵素分解に対する抵抗性を付与する目的で、C 末端をアミド化、N 末端をアセチル化した同アナログを化学合成し、その性状を評価した。その結果、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、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、in vitro は勿論、in vivo においても比較的低用量で抗菌活性を示したことから、同アナログは抗菌・抗LPS剤として有益であることが判明した。18-mer LLKKK アナログを生体に適用するための担体として選択した酸処理ゼラチンは同アナログの徐放性能に優れ、細胞毒性及び染色体毒性を示さなかった。埋植試験において軽度の異物反応が認められたが、顕著な炎症反応は誘導されず、生分解性及び生体適合性ともに比較的良好な成績が得られた。今後、製品化も視野に入れ、更に研究を進める予定である。

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

乾熱滅菌での損傷と高圧蒸気滅菌での損傷で損傷回復に差が認められたのは、培地性能の差だけではなく、滅菌メカニズムの差ならびにBI菌の特性の違いにも拠る。それらの相違のために要求する損傷回復剤が異なると考えられる。また損傷菌については培養温度を低くさせ、長期間培養する必要があると思われる。EOG、放射線、電子線滅菌での損傷菌生育培地での複合アミノ酸の主たる効果はL-アラニンに拠ると考えられる。加熱滅菌での損傷回復の場合にはピルビン酸も損傷回復に有効であったがEOGならびに放射線滅菌ではピルビン酸の有効性は余り認められなかった。その相違は滅菌による損傷メカニズムの相違に拠ると考えられる。

3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

LLNAにおいてATP量及びalarBlue取り込み量を指標としたときのSI値はリンパ節重量を指標としたときより大きな値が得ら

れた。ATPはリンパ節細胞の摘出後の時間に影響されやすいことから1匹ずつの測定になるが、標識物質の注射や細胞培養の必要がなかった。alarBlue取り込み量の測定はプレートリーダーで短時間に、かつ同時に多検体を処理できる利点がある。BrdU取り込み量は腹腔内注射した後ELISAで定量するが、ELISA操作上のプレートの洗浄やインキュベーション時間等、細胞活性以外のところでの測定誤差の要因が大きいと思われた。また、吸光度のダイナミックレンジが狭く、SI値が高くなかった。検出感度の面を考慮すると、ATP発光測定法またはalarBlue蛍光測定法が非R指標として優れていると考えた。試験物質の投与回数を増加させると、いずれの指標とも高いSI値を示した。HCAはDNCBよりも高濃度で投与しているにもかかわらずいずれの非RI指標とも低いSI値しか得られないことから、感作性強度はDNCBに比べて弱いことがわかった。

DNCB、DBT、TMA及びMSを塗布したときB細胞比率は程度の差はあるが増加し、必ずしもB細胞の出現が感作性を意味するものではないと思われた。DNCBではヘルパーT細胞の増加と細胞傷害性T細胞の減少が起こった。一方、TMA及びMSはT細胞サブセットの比率に対し変化を示さなかった。フローサイトメーター測定の定量性については試験ごとにかなりの差があるため、ルーチン的に確固たる指標とするにはまだ問題があると思われる。In vitro 法では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おり、DNCBやNiSO₄が陽性反応を示した。今後、確立した試験法とするには試験物質を増やし、陽性か陰性かの判断だけでなく、相対的な強度比較が必要となる。

LLNAにおいて試験物質の感作性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。試験の結果、A00 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、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して、水溶性物質の皮膚中への浸透性を促進することが重要になってくる。DMSO、1%SLS 溶液は他の物質の皮膚への浸透性を高める作用があるが、刺激性があり溶媒対照群としての値は若干上がることがわかった。また、感作性物質による反応性も増強するため用いられている。1% Tween 80 溶液はこうした活性化反応を示さず、扱いやすさから今回の中では最も適切であると考えた。これを用いて、医療用具の生理食塩水抽出液を試験したが、いずれも活性化を起こさず、皮膚感作性はないと判断した。

再生医療技術の発展に伴い、細胞と材料を組み合わせた医療機器も使用される可能性がある。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り、量的なものが関係するもののIgE抗体が上昇することから製品への残存に注意が必要である。ウシコラーゲンはヒトにとっては異種タンパク質であるが、市販コラーゲン製医療機器の抽出液を投与しても総IgE抗体価は溶媒対照群と有意な差は認められず、アレルギーを起こす可能性は少ないと判断した。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ず陰性の判定が出ている可能性もある。止血用ゼラチンスポンジの抽出液を投与した動物で総IgEが高いものが見られたが、この原因は不明である。今後、特異的IgEの検出や定量

がアレルギー性の特定と強度の比較に必要となるが、同時に抽出法の確立も重要となる。

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では、接合材の破損に関しては、プレートに最も注意を払うべきと思われる。埋植機器の使用後の転帰に関しては、機器全体と異なって、傷害例が最も多くなっていた。埋植機器の性質上、機器の不具合が健康被害に直結することが多いのであろう。整形外科関連埋植機器については、特に特定分類の報告数が目立つと共に、年々顕著に増加傾向があるのが懸念される場所である。埋植機器の不具合別の年推移では、ゆるみに増加傾向があり、どの機器においてもゆるみの報告が増加していることが分かる。

薬事・食品衛生審議会への不具合報告では、透析器、眼内レンズ、血管用カテーテル等については、使用数も非常に多いことにも依ると考えられる。埋植機器での、最も報告数が多い眼内レンズは、特定モデルの580件の報告が総数を押し上げている。整形外科分野の報告も多い。力学的な負荷も大きいため、使用条件は厳しいものがあるが、増加傾向は懸念される。人工股関節については、特定モデルの220件を越す報告が総数を押し上げている。なお、人工股関節と膝関節の報告数は、日米でその数が逆転している。市販総金額も日米では逆であり、その寄与が大きいかもしれない。数量的にも日本での人工股関節の販売数量は膝関節の倍近くである。ペースメーカーなどの心臓関連の機器の報告数は明らかな増加傾向を示している。これらの機器は定期的に医療機関で検査を受けており、電気的な不具合等が発見され易い環境にあることも報告数が多い一因と思われる。日本国内の不具合集計では、集計期間が短いために、この期間に集中報告された事例が、そのまま総

数に反映されてしまうケースが多かった。従って、今回の集計結果を全体的な傾向と見るのは無理があることを留意する必要がある。医療機器は、医薬品と異なって複雑な操作を要する場合があります、適応状態も様々であって、個々のケースを詳細に検討しなければ不具合の断定は困難であると共に、検討しても原因が不明なこともある。不具合の発生比率も考慮に入れる必要がある。要するに、本集計での不具合が多いことを、そのまま、各機器の安全性の評価に直結して考えないでいただきたい。

埋植した合金材料の検討では、Ni 埋植群では、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、埋植長期ではNi 材料が体外に排出されてしまった例もある。ラットのNi 材料に対する回復力の強さとNi の毒性をあらためて知らされた思いがする。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。Ni が大きな悪影響を及ぼすことを示している。材料自身は、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。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。

埋植後の組織変化においては、純Ni 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

群の例で好酸球の浸潤が観察され、この症例のみが軽度のアレルギー性変化を生じたものと考えられる。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。

合金材料からの溶出試験においては、材料からのNi 溶出実験データでは、1週より3週でかなり増加し、Ni 材料の乳酸条件では7倍になっていた。Ti/Ni 材料では、Ni を55%含むにも関わらず、Ni の溶出は全体的に微量に留まり、純Ni 材料の1/80(食塩水)程度であった。このNi の溶出の難易度の差が今回の動物実験での組織反応の差に直接繋がっているものと思われる。各材料からのTi 溶出実験データからは、Ti の溶出は、Ti-6Al-4V 合金の方がTi/Ni 合金より多い傾向がある。V の溶出はTi-6Al-4V 合金でも非常に微量であった。

Ni アレルギーは医療機器だけではなく、家庭用品での接触皮膚炎としてもよく知られている。米国の医療機器の不具合情報でも、Ni によるアレルギーの報告が散見され、全体的にステンレス中のNi によるアレルギーが大半を占めている。Ti/Ni 合金によるNi アレルギーの報告はまだ見られていない。Ti アレルギーについては、確定例は非常に少ないと思われるが、Ti アレルギーが周知されていないことも、報告が少ない原因と感ずる。Ti イオンが不安定であり、アレルギー試験に適切な試験物質がないこと、Ti 金属が不動態を容易に表面に形成してしまうこと、がアレルギーの検出を非常に難しくしていることであろう。今後、Ti インプラントが汎用されるようになると、アレルギー患者も増えてゆくかもしれないことが