

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

医療機器・医用材料のリスクアセスメント

手法開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成20年（2008）年4月

## 目次

### I. 総括研究報告

医療機器・医療材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究 土屋 利江	総-1
--	-----

### II. 分担研究報告

1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発 齧島 由二	分-1
2. ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発 松岡 厚子	分-12
3. 骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発 伊佐間 和郎	分-17
4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発 澤田 留美	分-26
5. 抜去インプラントの不具合要因解析によるリスクアセスメント手法開発 迫田 秀行	分-30
6. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発 佐藤 道夫	分-45
7. 神経機能に及ぼす人工脳硬膜の安全性評価手法の開発 ～直径 8mm のポリ乳酸ラクチドポリマー膜頭蓋内埋め込みラットの行動学試験による神経毒性評価～ 角田 正史	分-74

8. コンピュータシミュレーションによる人工膝関節のリスクアセスメント手法開発に関する研究  
分-84  
東藤 貢
9. 流体力学による脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメント手法開発  
分-87  
太田 信
10. コンピュータシミュレーションによる人工股関節のリスクアセスメント手法開発  
分-90  
堤 定美
11. ヒト単球由来細胞などによるアレルギーのリスクアセスメント手法開発  
分-93  
加藤 玲子
12. 医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究  
分-100  
中岡 竜介
13. ラットを用いたフラーレン(C60)の中枢神経への直接投与による脳機能への影響に関する研究  
分-107  
土屋 利江、 山田 貴史

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I 総括研究報告

平成19年度総括研究報告書

医療機器・医療材料のリスクアセスメント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

研究要旨：

本研究では、多種多様な医療機器医用材料に必要なリスクアセスメント手法開発に関し、特徴ある先端的な手法も導入し、13項目からなる課題に取り組み、以下の成果を得た。

1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

本研究では、機能性材料上で培養した細胞の安全性を評価する手法としてプロテオミクス解析の有用性について検討する。平成19年度は、第一のアプローチとして、モデル材料であるスルホン化プレートを作製し、その物理化学的性状を解析すると共に、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響について検討した。細胞培養プレート表面へのスルホン基の導入量は処理後2時間まで時間依存的に増加することが明らかになった。また、プレート表面の静的接触角はスルホン化処理時間に比例して低値を示すことも確認された。

TetraColor ONEを用いて測定した細胞増殖度はスルホン化処理により大きな影響を受けなかったが、蛍光イメージングにより細胞数を解析した結果、増殖率はスルホン化処理時間に比例して減少することが確認された。一方、分化マーカーであるALP活性、オステオカルシン産生量、Ca産生量はスルホン化時間に比例して顕著に上昇することが確認された。また、同プレートはCHL/IU細胞に対して細胞毒性及び染色体異常誘発性を示さなかった。スルホン化プレート上で培養したヒト正常骨芽細胞の遺伝子発現解析を行った結果、培養初期から培養後期の各段階において、IGF、EGF、TGF- $\beta$ 、BMP、PDGFなどの成長因子が骨芽細胞の分化進行に関与していることが示唆された今後、同プレートに吸着される蛋白質の同定を試みると共に、骨芽細胞の分化促進メカニズムを蛋白質発現解析により検討する。

2. ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発

市販および複数の研究者からナノマテリアルを入手し、生物試験への材料分散液の調製法の検討および分散液中の粒子径と細胞毒性の関連について検討した。分散法としては、卓上型超音波洗浄機およびメノウ乳鉢による粉碎を行なった。その結果、材料によっては、粒子径100nmレベルまで粉碎できたものもあったが、ほとんどが $\mu\text{m}$ レベルの粒子が残っている状態であった。分散がまだ不十分な状態であったが、粒子径測定と細胞毒性試験を平行して実施した結果、粒子径が小さい方が強い細胞毒性を示す傾向がみられた。また、共焦点顕微鏡観察により、蛍光標識ビーズ(直径2 $\mu\text{m}$ )が細胞内へ取込まれていることを確認することができた。

3. 骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。そして、擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる。そこで、フーリエ変換赤外光音響分光法を用いて、擬似体液中でのアパタイト形成能の評価を試みた。ハンクス平衡塩溶液浸漬によって、純金属であるTi、Zr及びAlはアパタイトを形成したが、Nbはアパタイトを形成しなかった。また、Ti-Zrもハンクス平衡塩溶液浸漬によってアパタイトを形成した。さらに、Nbを添加したTi-Zr基合金は、ハンクス平衡塩溶液浸漬によって、Nb含量の増加と共にアパタイト形成量が減少した。Ti-Zr-Nb合金にアパタイト形成能を付与するための表面処理法の開発が望まれる。

#### 4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

人工心臓弁を体に埋植した際の機能不全の主な原因と考えられる血栓形成やパルス形成について、その原因となる日本人の遺伝子多型を探索することを目的として人工心臓弁の機能不全の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 SNP タイピングを行う。

#### 5. 抜去インプラントの不具合要因解析によるリスクアセスメント手法開発

人工関節置換術は QOL の大幅な改善が期待される有用な治療法であるが、不具合により再置換術が必要になることも多い。不具合の低減のためにはその要因を解明する必要がある、不具合により摘出された抜去インプラントの解析が有効であるが、不具合はインプラントにのみ起因するわけではないため、その際には診療情報を含めた総合的な判断が必要である。

インプラントに起因する不具合は、摺動面に使用される超高分子量ポリエチレン部品の摩耗や疲労がその要因になることが多い。超高分子量ポリエチレンの摩耗については研究が進み、対策も進んでおり、今後はこれに替わり疲労の問題が顕在化する可能性が考えられる。しかし、疲労については評価方法が少なく、特に抜去インプラントに適用可能な方法がないため、疲労特性と不具合の関連については不明なことが多い。そこで、抜去インプラントの超高分子量ポリエチレン部品の疲労特性を評価する方法を確立するため、ECT 試験を提案し、種々の試験条件による影響を調べた。その結果、公称応力と破断までのサイクル数の間に高い相関が見られること、抜去インプラントから試験片を取り出す際に問題になると考えられる、寸法の誤差や表面性状のばらつきなども問題にならないことがわかった。この方法により、抜去インプラントの超高分子量ポリエチレン部品の疲労特性が容易に評価可能になると考えられた。

#### 6. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発

医療機器のリスクアセスメント手法の一環として、医療機器の不具合データを解析することにより、医療機器の不具合リスクとその傾向を明らかにし、それをもって不具合を低減するための手法を提供することを最終目的とする。方法としては、米国の膨大な医療機器不具合報告の公開データを入手し、データベースに再構築後、機器の種類、不具合ごとに分類し、時系列に追うことで、不具合の傾向を掴む。今年度は、まず、不具合報告が多い医療機器として、心臓血管系を中心に上げ、その中でも頻出する不具合、及び機器をリストアップすると共に、最近増加傾向にあるものを抽出して解析を行い、健康被害の割合も勘案した。これらから、糖尿病検査・治療関連の報告が非常に多いことや、心臓血管系の不具合が多いことが分かると共に、その中でも埋め込み型除細動器・ペースメーカーの電気関連の不具合(特に導線の破損)、薬物放出型冠動脈ステントでの閉塞に最も注意を払うべきと思われた。

#### 7. 吸収性材料による長期生体影響(神経毒性)のリスクアセスメント手法開発

人工硬膜と同じ濃度のオクチル酸スズ(OT)を含有したポリ乳酸等共重合体ポリマー膜及びジブチルスズ(DBT)を高濃度(100ppm)含んだポリ乳酸等共重合体ポリマー膜、OTを高濃度(200ppm)含んだポリ乳酸等共重合体ポリマー膜を、ラットの頭蓋骨に直径8mmの穴を開けて手術で埋め込み、神経系への影響を代表的な行動学試験、オープンフィールド試験及びprepulse inhibition (PPI) testで検討した。オープンフィールド試験及びPPI testで、群間で有意な差がなかった。直径8mmの穴を開けた場合、大脳表面の損傷は前年度1cmと比較すると少なかった。本研究のプロトコールに関する限り、ポリ乳酸等共重合体ポリマー膜で大きな生体影響は見られなかった。

#### 8. コンピュータシミュレーションによる人工膝関節のリスクアセスメント手法開発に関する研究

人工膝関節のリスクアセスメントを目的として、膝関節にとって力学的に最も厳しい動作状態のひとつであるスクワット等の深屈曲動作を再現する数値解析モデルを開発し、現行機種および開発中の次世代機種のリスクアセスメントに応用した。その結果、動作過程での応力の推移の可視化、損傷や摩耗の原因となる応力集中箇所の特長、機種間の安全性の比較等を効果的に行えることが示された。

## 9. 流体力学による脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメント手法開発

脳動脈瘤用ステントの血流障害能力は、ステントの高機能化に伴い、必須条件の一つとされているが、能力の定量化およびそれに伴うリスクアセスメントの研究はまだない。そこで、本年度本研究では、コンピュータを用いた数値流体解析によって行う手法の開発を行い、能力の定量化の検討を行った。特に、バルーンエクステンダブルステントの3次元形状データを実際の患者の脳動脈瘤3次元形状データに融合し、数値流体解析を行う手法を確立した。

## 10. コンピューターシミュレーションによる人工股関節のリスクアセスメント手法開発

人工股関節の力学的耐久性を評価するために、有限要素解析を用いた疲労寿命推定シミュレーションを行った。臨床で用いられているステム部材の有限要素モデルを作成し、ステムの設計形状をパラメータとして、ISO7206 基準の拘束条件を適用したシミュレーションを行った。シミュレーションの結果、ステム径、CT長さの変更によって疲労寿命が変化し、サイズの変更だけでは力学的耐久性に優れ、かつ患者に適合するステム設計に対応できないことが示唆された。また、こうしたパラメータ評価においてシミュレーションの有効性が示された。

## 11. ヒト単球由来細胞などによるアレルギーのリスクアセスメント手法開発

医療機器および材料のアレルギー性を評価する *in vitro* の評価法は未だに確立されていない。現在、動物代替試験が推奨されるようになってきており、*in vitro* での評価法の開発が急務である。本研究は医療機器におけるアレルギー性に対する *in vitro* でのリスクアセスメント手法開発を目的としている。H19年度は h-CLAT を用いて医療機器の作製時に用いられる可能性がある添加剤の感差性の評価ができるかの検討をおこなった。その結果、今回用いた添加剤のシリーズは感差性マーカーである CD54 の発現は上昇させるが、CD86 には影響がないことが分かった。今後、同添加剤で Local Lymph Node Assay (LLNA) などを行い、今回の結果と比較して本評価法が適切な評価法となりうるかの検討を今後行う。

## 12. 医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

医用材料と炎症系細胞との *in vitro* での相互作用解析を行うことで、その材料が生体内埋植後引き起こす炎症反応の程度を予測可能か検討する。初年度はヒト単球由来細胞を用いて解析を行うための条件設定を行った。また、モデル材料表面として、自己組織化膜を用いた種々の単一官能基表面調製に関する検討を試み、6種類の官能基表面を調製した。

## 13. ラットを用いたフラーレン(C60)の中樞神経への直接投与による脳機能へのリスクアセスメント手法開発に関する研究

フラーレンは、様々な生理作用を有したナノ粒子であり、側鎖に特定のタンパク質を修飾することで、薬剤などを特定の部位に運ぶという作用も期待される。我々は、脳神経系をターゲットとしたフラーレンの医療材料としての利用または神経再生医療材料としての利用を考え研究を進めている。フラーレンを医療材料として用いるにあたり、その毒性、腫瘍形成、変異原性、発ガン作用などについて精査する必要がある。これまでにいくつかの報告がされてきたが、脳神経系に関する安全性の評価に関する報告はほとんどない。さらに、中樞神経には血液脳関門があり、脳に入る物質を厳密に制限している。すなわち、フラーレンの脳神経系への影響をみることで、さらに中樞神経への直接的な接触時の影響についても調べる必要がある。そこで本実験では、フラーレン (fullerene60) を、ラットの側脳室に直接投与し、行動試験による行動の変化や神経伝達の変化などについて測定を行った。

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

松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

配島由二 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

東藤 貢 九州大学応用力学研究所  
准教授

加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 主任研究官

材料を開発したグループによって実施されてきている場合もあるが、試験法が一定ではなく、さらに、試験に供した分散液中の粒子に関する情報を提供しているものが少なく、結果を材料間で直接比較することが困難な場合が多い。そこで、本研究では、比較的簡便な方法で、ナノマテリアルの生物活性を測定でき、どのような材料にも応用できる手法を開発し、ナノマテリアル全般の細胞毒性をスクリーニングできる手法を提案したいと考えている。

ナノマテリアルと一言にいても、化学組成、結晶構造、形状、サイズの異なるものが開発されている。また、親水性のものもあれば、疎水性のものもあり、水への分散様式も異なる。本年度の研究では、おもに、卓上型超音波洗浄機とメノウ乳鉢での粉碎を用いて、ナノマテリアルを粉碎、あるいは分散させることを試みたが、まだ  $\mu\text{m}$  レベルの粒子が残っている状態である。従来化学物質の試験とは異なり、ナノマテリアルの生物試験では分散液中の材料の物理化学的特性を何か一つ指標として加える必要があると考えている。

角田正史 北里大学医学部衛生学  
准教授

療品部 主任研究官

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 研究官

佐藤道夫 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

太田 信 東北大学流体科学研究所  
准教授

堤 定美 京都大学再生医科学研究所  
生体機能部門 教授

中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 主任研究官

## A. 研究目的

医療機器・医用材料の製品化の段階において、各製品のリスクとベネフィットのバランスを基本とした、製品化の判断が重要な位置を占めている。したがって、各種医療機器や医用材料の安全性評価を行う上で必要なリスクアセスメント手法開発を行うことを目的としている。具体的には、以下の13課題について取り組む。

### 1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

材料上で培養した細胞の安全性評価や細胞機能の向上に関与する因子を解明する手法としてプロテオーム解析の応用を試みる。平成19年度の本研究では、第一のアプローチとして、細胞機能を増進させるスルホン基含有医用材料に着目し、細胞に対するスルホン基自体の影響を純粋に評価するための実験系を確立するため、表面にスルホン基を共有結合させたポリスチレン製細胞培養用マルチウェルプレート（スルホン化プレート）を作製し、その物理化学的性状を解析した。また、ヒト正常骨芽細胞の増殖と分化に及ぼすスルホン化プレートの影響について検討した。

### 2. ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発

ナノマテリアルの安全性については、これまで、

### 3. 骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

整形外科領域で使用される骨系埋植医療機器には、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 $\gamma$  ネイル、髄内釘、人工関節などがある。これら骨系医療機器の使用は年々増加しており、構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって、不具合の報告件数も増加傾向にある。そのため、有効性及び安全性を高めるための研究が活発に展開されている。特に、埋植初期に見られる機器の破損や埋植部位近傍の骨折は、埋植した機器と骨との接着不足が原因であるとされており、埋植早期に生体骨と強く結合するような性質を付与した材料が開発されている。現在、骨系医用材料の骨結合能は、主に動物実験によって評価されているが、費用や時間、動物愛護などの観点で問題がある。したがって、動物実験に頼らず、臨床実態を反映するような骨系医用材料の骨結合能の評価法の確立が強く望まれている。

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。そして、擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる<sup>3</sup>。昨年、擬似体液を用いるアパタイト形成能の評価法が、ISO 23317:2007: Implants for surgery -- In



vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materialsとして国際標準化された。この評価法では、材料表面に形成したアパタイトを、走査型電子顕微鏡及び薄膜 X 線回折法を用いて経時的に測定するだけである。そこで、試料の形態を選ばず、定量的な解析も可能なフーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) を用いて、アパタイト形成能の評価を試みた。

従来から骨系医療機器に使用されている 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。また、我々は、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あることを明らかにした。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 合金が数多く開発されている。Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、細胞毒性が無く、さらに、骨芽細胞適合性が高い。また、骨に埋植しても炎症反応を起こさず、骨組織適合性にも全く問題が無いことから、生物学的安全性及び有効性の高い骨系医用材料として期待されている。そこで、Nb を添加した Ti-Zr 基合金の擬似体液中でのアパタイト形成能について検討した。

#### 4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

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、その治療として人工弁置換手術が行われている。現在、臨床的に用いられている人工弁は、機械弁、異種生体弁、凍結保存同種弁であるが、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。しかしながら、人工心臓弁の機能不全についての報告もあり、その主な原因としては、血栓形成とパルサス（心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織）形成が挙げられている。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。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、パルサスの形成についてはそのメカニズムは未だ明らかにされていない。一方で、人工心臓弁置換手術技能によって機能不全が起こることも考え得るが、異物に対する生体反応等に個体差がある可能性も否定できない。

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ルサ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していく。

#### 5. 抜去インプラントの不具合要因解析によるリスクアセスメント手法開発

人工関節置換術は変形性関節症や関節リウマチの患者で、疼痛などの理由により歩行や起立が困難になるなどの場合に行われる。歩行が可能になるなど生活の質 (QOL) が改善されることから、一般的に広く普及した治療法であり、本邦では年間約 10 万例が行われている。

一方で、不具合により抜去される事例も増加している。重篤な不具合が発生した場合は再置換術を行うが、不具合を起こしたインプラントを抜去する必要であることや、インプラントを支える骨の量が初回の手術に比べ減少しているなどの理由で、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。また、患者やその家族にとっては、手術による身体的負担や、長期の入院による経済的、社会的負担が生じ、社会全体としても医療費などの負担が生じることになる。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っている。

摩耗と摩耗粉の発生を抑制するため、高密度架橋ポリエチレン (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。この材料は UHMWPE にガンマ線や電子線などの放射線を照射することで UHMWPE の分子鎖に架橋を施し耐摩耗性を向上させ、その後の熱処理により安定性を付与したものである。しかし、これらの一連の工程により疲労特性が低下してしまうことがわかっている。

疲労特性の低下は特に人工膝関節における摺動面のデラミネーション破壊の原因になると考えられている。また、人工関節の UHMWPE コンポーネントには、金属製コンポーネントに固定するための切り欠きや突起が多くあり、潜在的に疲労破壊の危険性がある。その他、PS タイプと呼ばれる人工膝関節のポスト部は、力学的に過酷な条件になるため、疲労破壊の危険性が高い。人工股関節では、インピンジメント (大腿骨側のステムのネック部分が寛骨臼側の UHMWPE 製ライナーのリム部に接触してしまう現象) による UHMWPE コンポーネントのリム部の破壊が懸念される。現在は摩耗の問題により再置換にいたる症例が比較的多いが、HXLPE の普及により

摩耗の問題が解決した場合、これに替わり疲労の問題が顕在化する可能性が考えられる。

人工関節用 UHMWPE の疲労特性の評価は compact tensile (CT) 試験片を使用した疲労き裂成長試験<sup>3,10)</sup>によるものが多い。しかし、CT 試験片の作製に必要な寸法による制限により抜去インプラントへの適用は難しい。そのため、疲労特性の低下と不具合の関連性については不明なことが多い。

UHMWPE の摩耗については多くの評価法が確立されている。そのため、摩耗と不具合の関連が明らかになり、新規材料の開発やその評価が可能であった。HXLPE の開発にいたる一連の研究やその評価においては、これらの評価法が重要な役割を果たしたと考えられる。これに対し、疲労特性に関する評価法は少ない。そこで、抜去インプラントの入手と並行して、抜去インプラントに適応可能な疲労特性評価法の確立を今年度の目的とした。

## 6. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発

医療機器のリスクアセスメント手法の一環として、医療機器の不具合データを解析することにより、医療機器の不具合リスクとその傾向を明らかにし、それをもって不具合を低減するための手法を提供することを最終目的とする。検討対象とする医療機器の不具合データとしては、公開データが入手可能であること、またそのデータが 16 年の長期にわたる膨大なものであるために偏りが無いと思われること、日本国内でも米国製の医療機器が輸入されて多数が使用されていること、などから、米国の医療機器不具合報告を取り上げる。機器の種類、不具合の内容を分類し、時系列に解析することによって、不具合の傾向を知ることが第一の目的となる。

FDA は Manufacturer and User Facility Device Experience Database (MAUDE) という不具合情報収集システムを確立し、企業からの不具合情報提供を義務づけていると共に、広く情報を集めている。収集された情報はインターネットで公開しており、Web ページでのオンライン検索の他、データを圧縮したファイル形式でも提供している。1991 年末から 2007 年までの 16 年間で 912,265 件に及ぶ報告を収集しており、市販後評価の貴重な資料となる。

米国の医療機器不具合報告データの集計・解析に関する研究は、当分担研究者による先駆的なデータベース作成研究、及び集計解析を行った研究に続いて、人工股関節などの部分的な分野で行われている例はあるが、各企業で個別機器について調査が行わ

れている他は、あまり例がない。金属材料に焦点を絞った研究や内外比較研究をさらに発展させると併に、今年度は、不具合報告が多い心臓血管系の報告を中心に取り上げた。

## 7. 吸収性材料による長期生体影響（神経毒性）のリスクアセスメント手法開発

近年、開発された脳外科手術時に使用される合成生体吸収性人工硬膜は、慢性炎症やウイルス感染などのリスクを避けられる。吸収性人工硬膜の臨床使用では中枢神経が化学物質に曝されるため、その安全性の評価は課題である。

人工硬膜はポリ乳酸等共重合体ポリマーの重合体から構成され、乳酸ポリマーの重合に、触媒としてジブチルスズ (DBT) 化合物及びオクチル酸スズ(2-エチルヘキサン酸スズ)(OT)の混合物が使われ、これらのスズ化合物は人工硬膜に残存する。これらの神経毒性については不明の点が多い。DBT は特に免疫系に強い毒性を示し、マクロファージ系細胞に関しては低濃度で強い毒性を示す (Tsunoda, et al., 2006)。過去 2 年の研究では、実際の手術のモデルとして実験動物に人工硬膜製品または DBT を高濃度含むポリ乳酸ラクチド膜、高濃度 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜を頭蓋内に埋め込み、代表的な行動学試験で特にスクリーニングに使用される、オープンフィールド試験と prepulse inhibition (PPI) test で評価を行った。埋め込み用の穴の大きさは、直径 5mm と 1cm で検討した。オープンフィールド試験は主に移所運動活性を測定し、あわせて一般適応行動変化を捉える (高田、1990)。PPI test は聴性驚愕反応を用いた試験法で、認知機能、学習機能を測定する (Inada, et al. 2003, Kobayashi et al. 2004)。5mm と 1cm の研究結果では、5mm では DBT 高濃度膜で対照群と比べ PPI test により認知・学習機能の障害が示唆されたが、1cm の場合は群間で有意性は示さなかった。

今までの研究の問題点として、頭蓋骨をくり抜く直径を 5mm とした場合は、多くのラットで骨の再生が早く、膜が再生骨と戻した頭蓋骨の間にサンドイッチされてしまう、という点があった。1cm の場合は再生骨に挟まれていたのは 10 例中 1 例のみであったが、大脳表面の損傷が顕著なラットが多かった。共に実際の手術のモデルとしては問題を含み、両者の中間の直径を検討することで、モデル実験に適切な頭蓋骨のくり抜きサイズを検討する必要があると考えた。

そこで、本年度の研究では、頭蓋骨のくり抜きの直径を 8mm に設定し、control 群、実際の人工硬膜と同じ濃度の OT(スズ濃度で 20ppm) を含有す

るポリ乳酸ラクチド埋め込み群、高濃度 DBT(100ppm)含有ポリ乳酸ラクチド埋め込み群、高濃度 OT(200ppm)含有ポリ乳酸ラクチド埋め込み群を設定し、それぞれに頭蓋に手術を行い、1 月経過後にオープンフィールド試験及び PPI test を用いて行動毒性を評価した。以上により、人工硬膜の安全性評価手法に適切なモデルを確立することを試みた。

#### 8. コンピュータシミュレーションによる人工膝関節のリスクアセスメント手法開発に関する研究

高齢化社会の到来に伴い、変形性関節症や関節リウマチなどの膝関節障害により歩行さえも儘ならない人々が増大している。重度の場合には、人工膝関節置換術を施すことで膝の運動機能は大幅に回復し、通常の歩行はもちろんのこと、軽度の運動までもが可能となる。しかし、長年の使用により特に超高分子量ポリエチレン製の脛骨インサートの損傷や摩耗が問題となっており、現行機種のリスクアセスメント及び新機種の開発においても脛骨インサートの耐久性等の評価が重要となってきている。

本研究では、コンピュータシミュレーション技術を応用して、複雑な 3 次元形状を有する人工膝関節が実際の動作状態においてどのような応力状態にあるのかを高精度で把握し、リスクアセスメントを可能とする数値解析手法を開発することを目的とした。

#### 9. 流体力学による脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメント手法開発

脳動脈瘤の破裂は人々のそれまでの健康な暮らしを一変してしまう可能性があり、破裂前もしくは破裂直後の治療が大変重要である。治療法の一つに脳動脈瘤内への血流を遮断するデバイスを留置する血管内治療は、低侵襲的で患者に対する負担も少ないとされることから、近年高く注目されている。ステントは従来血管拡張を目的に留置をされてきたが、Aneisら(J. Biomech. Eng., 1997)は理想的な脳動脈瘤形状を用いた数値流体解析を行い、ステントのみによって脳動脈瘤内の血流の速さが低下する可能性があることを示唆した。その後、Barathら(Neurol. Res., 2005)は、in-vitro の理想的動脈瘤モデルにステントを留置し循環装置につなぎ、ステントによる瘤内の血流速さの低下を測定した。これらの結果より、これまでコイルが不適用なワイドネックな脳動脈瘤に対して、ステントのみを留置することによって脳動脈瘤内の血流を低下させ治療に用いられる可能性が示唆された。しかし、これまでの研究のほとんどが理

想的なステント形状と動脈瘤形状を用いた研究であり、実形状ステントと実形状動脈瘤を使用した研究はこれまでになかった。これはステントの形状が非常に小さく、またステントを構成するストラットが非常に細いため、通常の CT などの 3 次元再構築法では再現できなかったためである。しかしながら、医療機器の観点から見た場合、実形状を用いた解析は必須であることから、本研究ではステントの実形状計測と留置に関する研究とそれに関連した研究を行い、リスクアセスメント手法を開発することを最終目的とする。本年は、ステントの実形状計測とシミュレーションに関する研究をまとめた。

#### 10. コンピュータシミュレーションによる人工股関節のリスクアセスメント手法開発

人工股関節埋入後の問題の一つとして、長期経過後のインプラントのゆるみや疲労破損が挙げられる。人工股関節の疲労寿命は、現在、ISO や ASTM において実験的手法による評価方法が規格化されている。実験的手法は時間がかかるだけでなく、コストも高く、設計パラメータの変更などに対応できない。また、統計的な信頼性のために同じ実験を繰り返す必要がある。こうした問題を解決するために、有限要素法を基にした数値シミュレーションによって疲労寿命を評価する。本研究では、患者への人工股関節のサイズ適合性を検討するために、人工股関節システムのスケールが疲労強度に及ぼす影響について数値シミュレーションを行った。

#### 11. ヒト単球由来細胞などによるアレルギーのリスクアセスメント手法開発

化学物質の皮膚感作性を評価する皮膚感作性評価法 (Skin sensitization test) は動物実験の Guinea Pig Maximization Test (GPMT) が使用されたが、LLNA (Local Lymph Node Assay) が濃度依存的評価や動物数と期間と費用の減少などで優れていることから、現在の皮膚感作性の動物実験には LLNA が多く使われている。

一方、動物実験の代替法の一つである human Cell Line Activation Test (h-CLAT) は最近日本の化粧品会社や欧国の研究所から報告されている新しい方法である。これは、*In vitro* の感作で主な役割をしている Langerhans cells (LCs) や Dendritic cells (DCs) を用いて評価する方法である。皮膚感作が進むと、APCs である LCs は naive T cells を感作する為に second lymphoid 器官に移動し、未成熟 DCs は phenotypic 変化と多様な intercellular adhesion 分子、co-stimulatory 分子、major

histocompatibility complex II (MHC II) 抗原 (CD54, CD86, HLA-DR antigens) と共に成熟 DCs になる。本研究では DCs の cell line である THP-1 cells を用いて、アレルギー性の物質を細胞に添加し、HLA-DR の表面の CD86 と CD54 の発現を観察することによってアレルギー性を *In vitro* で評価する方法を用い、バイオマテリアルや添加剤の安全性と毒性を評価した。さらに *In vivo* の Local Lymph Node Assay (LLNA) を用いて添加剤の影響を検査し、*In vitro* の結果と比較して h-CLAT 手法の妥当性を様々な角度から評価している。

## 1.2. 医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用が最大の要因である。まず、埋植直後にはその周囲組織に炎症反応が生じるが、この炎症は様々な不具合の要因となりうるため、材料によって引き起こされる炎症度合を *in vitro* で評価できる方法の開発が必要とされている。そこで、汎用性の高い種々の医用材料や、特性を様々な変化させたモデル表面上での炎症系細胞の挙動変化を検討すれば、埋植後の炎症反応とその医療機器表面との関連性を明らかにすることが可能になると考えられ、さらには、実際に動物に埋植した後の炎症反応と詳細に比較検討することで、より信頼性の高い *in vitro* での医用材料の炎症リスク評価が可能となると予想される。また、このような研究は数多く存在するにも関わらず、種々の材料を対象として系統的に行われた研究は殆どない。よって、本研究では、*in vitro* で炎症系細胞との相互作用解析を行い、その材料が実際に生体内に埋植された後に引き起こす生体反応、特に炎症反応程度を予測可能な手法の開発することを試みる。それと同時に、炎症などの生体反応と材料特性との関連性の有無や、材料により引き起こされる炎症の機構を明らかにする。

## 1.3. ラットを用いたフラレーン(C60)の中樞神経への直接投与による脳機能への影響に関する研究

フラレーン(C60)は、炭素原子 60 個からなるサッカーボール状のナノ粒子のクラスターである。フラレーンに関する多くの生理作用、薬理作用も報告されている。フラレーンのラジカルスポンジ作用は、ラジカルをトラップし、無害化する。また、 $\beta$ アミロイドタンパクの amino 酸配列のうち、疎水性部分に結合し、ベータシート化することを抑えることで、 $\beta$ アミロイドの会合阻害をする。また、DNA を切断する作用があり、フラレーンの側鎖の構造に依存し、標的となる DNA の破壊や、制限酵素のような働きを

する。一方で、光刺激に反応し、活性酸素種を発生する。HIV 逆転写酵素の活性部位に結合し、この酵素を失活させるなどの報告もされている。このように、フラレーンは生体に、様々な影響を及ぼす可能性が示唆され、生体への多くの利用価値があると考えられるが、それと同時に適切かつ安全に利用する必要がある。

フラレーンの中樞神経に対する毒性に関する資料は現在ほとんどない。Satoh らは、フラレーンを 100mg/kgB.W. でマウスに腹腔投与し、痛覚感受性試験、筋力試験、回避試験や情動試験を行ない、急性の影響について評価したが、対照群との差はみられなかった。また、フラレーンを 30mg/kgB.W. でマウスの腹腔に投与し、4 週間後に動試験により、長期的な暴露での影響についても観察したが、対照群との差は観察されなかった。しかしながら、フラレーンが中樞神経に取り込まれるのか、また、取り込まれたとしたらその量はどの程度なのかは明らかになっていない。神経中樞神経への物質の取り込みは血液脳関門に制御されている。現在までに、フラレーンの血液脳関門の透過性に関する報告はされていないが、バイオマテリアルとして、フラレーンを中樞神経に導入する場合には、中樞神経での直接的な毒性を評価しなくてはならない。そこで本試験では、ラットの側脳室にフラレーンを直接投与し、フラレーンの中樞神経への影響・毒性について検討した。

## B. 研究方法

### 1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

#### (1) スルホン化プレートの作製

Wakabayashi らの報告に従い、住友ベークライト社製 (SUMILON) 及び CORNING 社製のポリスチレン製細胞培養用 24 ウェルプレートの各ウェルに濃硫酸 (和光純薬, 超微量分析用) 1 ml を添加した後、37°C で種々の時間インキュベートした。処理後、水道水、重曹水及び蒸留水により順次洗浄し、乾燥後、クリーンベンチ内で UV を照射して滅菌した。

#### (2) XPS 解析及び静的接触角の測定

XPS 解析は、スルホン化プレート底面をウェル毎に 5 x 5 mm 程度に切断した試料片を用い、島津製作所製 ESCA-3200 により行った。

静的接触角 ( $\delta$ ) は、スルホン化プレート底面をウェル毎に 1 x 1 cm 程度に切断した試料片上に 5  $\mu$ l の蒸留水を滴下し、1 分後に ERMA 接触角測定器 G-1-1000 を用いて液滴の幅と高さを計測し、以下の計算式から算出した。

$$L^2 = (w/2)^2 + (L-h)^2$$
$$\sin \delta = (w/2)/L$$

L: 液滴の半径 (mm)  
w: 液滴の幅 (mm)  
h: 液滴の高さ (mm)  
 $\delta$ : 接触角

### (3) ヒト正常骨芽細胞の培養

ヒト正常骨芽細胞(CAMBREX, 1D, Female, 0/C)は三光純薬から購入した。培地としては、5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム、10 nM デキサメタゾン及び10%牛胎児血清を含有する $\alpha$ -MEM (GIBCO) 培地を使用した<sup>10)</sup>。細胞培養用プレートとしては未処理及び種々の時間スルホン化処理を施した 24 ウェルプレート (SUMILON) を使用し、1 ウェル当たり  $4 \times 10^4$  個のヒト正常骨芽細胞を播種し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37°C で種々の期間培養した。

### (4) 増殖・分化能の測定

ヒト正常骨芽細胞の増殖度は、30  $\mu$ l/ml の生細胞測定用試薬 TetraColor ONE (生化学工業) を含有する培地 (1 ml) に交換し、37°C で 2 時間インキュベート後、150  $\mu$ l の培養上清を 96 穴プレートに分注し、450 nm (対照波長: 600 nm) における吸光度を測定して評価した。プレートリーダーとしては、BIO-TEK INSTRUMENTS, INC. 社製  $\mu$ Quant を使用した。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性は、TetraColor ONE 含有培地を廃棄し、PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄後、4 mM パラニトロフェニルリン酸、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> を含有する 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) 1 ml を各ウェルに添加し、37°C で 15 時間インキュベート後、上清 150  $\mu$ l を 96 穴プレートにサンプリングし、405 nm (対照: 600 nm) での吸光度を測定して評価した。

オステオカルシン量を測定するため、細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.2% NP-40 含有 PBS (0.5 ml  $\times$  2 回) により細胞を回収後、氷冷下、超音波破碎した。オステオカルシン量は細胞破碎液の遠心上清を試料として、Gla type Osteocalcin EIA Kit (Takara) のプロトコールに従って測定した。

Ca 産生量を測定するため、細胞を PBS で 3 回洗浄し、ホルマリン固定 (10% ホルマリン/PBS) 後、蒸留水で 3 回洗浄し、0.1 M 塩酸 1 ml を各ウェルに添加し、室温下、15 時間放置して塩酸抽出液を調製した。同抽出液 10  $\mu$ l を試験管に分注し、カルシウム C-テストワコー (和光純薬工業) のプロトコールに従って、0.88 M モノエタノールアミン緩衝液 (pH 11.0) 1 ml、0.63 mM オルトクレゾールフタレインコンプレクソン/69 mM 8-キノリノール混合液 100  $\mu$ l を添加し、室温下、15 時間インキュベート後、570 nm における吸光度を測定してウェル当たりの Ca 産生量を測定した。

各生化学的測定は 1 条件当たり 2 ウェル測定し、3 回の繰り返し実験から平均値と標準偏差を算出した。

### (5) 細胞の蛍光標識と画像解析

未処理及びスルホン化プレート上で種々の時間培養した細胞を PBS で 3 回洗浄した後、ホルマリン固

定し、蒸留水で 3 回洗浄した。各ウェルに 5  $\mu$ M の Hoechst 33258 を含有する PBS 1 ml を添加し、室温下、15 時間放置して細胞核を蛍光染色した。同細胞を PBS、0.1% Triton X-100、1% BSA 及び PBS で順次洗浄後、5  $\mu$ l の rhodamine phalloidin (Invitrogen) を含む PBS 200  $\mu$ l を添加し、室温下、20 時間インキュベートしてアクチンを蛍光染色した。再度、同細胞を PBS で洗浄した後、FITC 含有 PBS (10  $\mu$ g/ml) を添加し、室温下、20 時間放置して細胞膜を蛍光染色した。同細胞を PBS で洗浄後、画像解析に供するまで 4°C で同緩衝液に浸潤させた状態で保存した。

細胞数の測定及び細胞形態の観察は In Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) を使用して行った。細胞核の測定波長は Ex 360 nm/Em 460 nm とし、アクチン及び細胞膜の観察は、それぞれ Ex 535 nm/Em 620 nm 及び Ex 475 nm/Em 535 nm で行った。細胞核及び細胞面積は 4 倍率画像 20 枚 (カバー率: 36.1%) から、In Cell Analyzer 1000 Workstation ソフトウェアを使用して計測した。細胞骨格長 (アクチン伸展長) は 3 枚の 20 倍画像 (カバー率: 1.1%) から、In Cell Analyzer 1000 Developer Tools ソフトウェアにより解析した。1 ウェル当たりの細胞面積及び細胞骨格長の総和を細胞核数で除すことにより、細胞当たりの平均面積と平均骨格長を算出した。

### (6) 遺伝子発現解析

未処理及び 240 分処理したスルホン化プレートにヒト正常骨芽細胞 ( $4 \times 10^4$  個/ウェル) を播種し、培養開始後、2 時間、4 時間、8 時間、1 日、3 日及び 6 日目の細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて tRNA を採取し、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) により tRNA 量と純度を測定した。濃度の低い試料は必要に応じてエタノール沈殿を行って濃縮した。

試料の純度をバイオアナライザー (Agilent) により再度解析した後、Human Genome U133 Plus Array (Affymetrix) を用い、One-Cycle Target Labeling 法により、mRNA 発現を網羅的に解析した。試験は Technical duplicate で行い、得られた Gene Chip データは GeneSpring (Agilent Technologies) を用いて解析した。

### (7) in vitro 毒性試験

染色体異常試験では、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) をプレートに播種し、10% FCS-MEM 培地を用いて 7 日間培養後、トリプシン処理、低張処理及び固定し、分裂中期像を顕微鏡下で観察することにより、構造異常の種類と数及び倍数性細胞の数を集計した。また、細胞毒性試験では、同細胞をプレートに播種し、7 日間培養後、固定、ギムザ染色し、コロニー数を測定した。

## 2. ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発

### 1. ナノマテリアル

1-1. 水熱合成チタニア・チタネートナノチューブ合成後の洗浄方法が異なる 4 種のサンプルおよび対照材料

Sample 1: エタノール洗浄

Sample 2: 水洗浄

Sample 3: 水—塩酸 (pH7) 洗浄

Sample 4: 水—塩酸 (pH 4) 洗浄

対照材料:  $K_2Ti_4O_9$ , 高純度化学研究所

1-2. 二酸化チタン ( $TiO_2$ , 純度>99.9%, ルチル 20–40%, アナターゼ 80–60%, 平均粒子径 80 nm, 和光純薬)

1-3. 単層カーボンナノホーン (図 1, NHAs および NHox (開孔), JST&NEC 湯田坂雅子先生提供)

1-4. フラーレン (図 1,  $C_{60}$ , nanom purple N60-S, 純度>99%, 平均粒子径 0.7 nm, フロンティアカーボン社)

1-5. 二酸化珪素 ( $SiO_2$ , 純度>99.9% 和光純薬)

1-6. グリソタイル B (UICC, 日本バイオアッセイ研究センター 浅倉真澄先生提供)

### 2. 細胞

当研究室で維持している、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 (CHL) を用いた。医薬品をはじめとする各種化学物質の非臨床安全性試験に繁用されている細胞株である。細胞は 10% 牛胎児血清添加 MEM 培地で、5% 炭酸ガス、37°C 条件下で培養した。

### 3. 細胞毒性試験

24-well プレートに、50 細胞/well の CHL 細胞を播種し、翌日、ナノマテリアルを添加し、そのままさらに 7 日間培養を続け、形成されたコロニーをメタノールで固定、ギムザ染色を行なった後カウントした。コントロール群のコロニー数を 100% とした時の、処理群の相対コロニー数 (Survival %, 平均値 ± SD, n=4) で細胞毒性を表示した。

### 4. ナノマテリアル分散液の調製

秤量したナノマテリアルをそのまま培地に懸濁する方法と、ナノマテリアルをメノウ乳鉢で 3.5 分間粉碎 (乾式粉碎) する方法を用いた。また、後者については、培地を少量添加した状態で 3.5 分間粉碎 (湿式粉碎) する方法も試みた。いずれの分散液も、最後に 20 秒間、卓上型超音波洗浄機 (W-113MK-II, 爆洗、110 W, 本多電子株式会社) にかけた。

### 5. 分散液中のナノマテリアルの粒子径測定

動的光散乱法を測定原理とする DLS-7000 (大塚電子製、測定粒子径範囲 3 nm–3  $\mu$ m、測定波長 632.8 nm (He-Ne レーザ)) を用いた。12 mm  $\phi$  のセルで測定した。

### 6. 蛍光標識ビーズの細胞内への取込みの可視化

共焦点顕微鏡 (Olympus Fluoview FV1000) を用いて、2  $\mu$ m  $\phi$  蛍光標識ビーズ (FluoSpheres, Molecular Probes) の細胞への接着等の観察を行ない、三次元断面を再構築することにより、細胞内への粒子の取込みを確認した。

カバーガラス底の 3.5 cm  $\phi$  プラスチックシャーレ (MatTek Corporation) に CHL 細胞を播種し、翌日蛍光標識ビーズを添加、一定時間後 formalin で固定、Triton X-100 処理、DAPI を含むグリセリン液で封入後観察した。

## 3. 骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

### 1. 試験材料

Ti-Zr 基合金として、Ti と Zr の原子比が 1 : 1 である Ti-Zr 並びに主成分である Ti と Zr の原子比を 1 : 1 に固定し、それに  $\beta$  相安定化元素のひとつである Nb を添加した Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb 及び Ti-Zr-24Nb を用いた。各 Ti-Zr 基合金の化学組成を表 1 に示した。また、純金属として、Ti、Zr、Nb 及び Al を用いた。

いずれの試料も直径 1.0 mm、長さ 7.0 mm のロッド状に加工した後、#400 (Al のみ #1200) のエメリー紙を用いて、側面をほぼ同じ表面粗さに研磨仕上げした。その後、酢酸エチル、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄した。

### 2. 擬似体液浸漬

内径 6 mm のテフロンチューブを用いて、試料の両端面を固定した後、テフロンチューブごと容量 50 ml のポリプロピレン製遠沈管に入れ、カルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハックス平衡塩溶液 (GIBCO 14025, インピトロジェン) 40 ml を加えた。遠沈管を温度 37.0°C に設定したインキュベータ内に 4 週間静置した。ハックス平衡塩溶液は週 3 回の頻度で新鮮なものと交換した。

### 3. デジタル顕微鏡観察

デジタルマイクロスコープはキーエンス VH-8000C を使用し、ズームレンズ VH-Z25 又は高倍率ズームレンズ VH-Z450 を装着した。ハックス平衡塩溶液浸漬後の試料表面を観察した。

### 4. 走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡は日本電子 JSM-5800 を使用した。試料は常法に従って金蒸着した後、加速電圧は 15 kV で観察した。

## 5. フーリエ変換赤外光音響分光分析

フーリエ変換赤外分光光度計は日本電子 JIR-SPX200 を使用し、光音響検出器は MTEC Model 300 を使用した。スキャンスピードは 0.4 mm/s、分解能は 8 cm<sup>-1</sup>、補間は 7 ポイント、スキャン回数は 256 回で測定した。試料を導入した後、試料セル内を乾燥空気ですばやくパージして水蒸気を除去した。また、カーボンブラック薄膜をリファレンス材料として用いた。

## 4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

### 1) 血液採取及び DNA 抽出

大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科において、人工心臓弁置換手術を過去に施された患者から採血し、その後同機関にて DNA を抽出する。検体として採取した血液は、大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科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。

### 2) SNP タイピング

血栓形成の原因となり得る遺伝子多型を探索するために、まずは、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、 $\gamma$ -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、さらに炎症反応に関わる遺伝子として VAMP8、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$  レセプター I (TGF $\beta$ RI)、TGF $\beta$  レセプター II (TGF $\beta$ RII) の 4 遺伝子で、計 6SNP を選択し、総計 29SNP についてタイピングを行う。

さらに、illumina BeadArray SNPs ジェノタイピングにて網羅的解析を行い、血栓形成およびパルス形成の原因となり得る遺伝子多型の探索を行う。

## 5. 抜去インプラントの不具合要因解析によるリスクアセスメント手法開発

### 1. 抜去インプラントの入手

大阪大学に抜去インプラントおよび診療情報の提供を依頼した。不具合により抜去された人工関節等のインプラントと X 線、年齢、性、身長、体重、手術日、職業、既往歴、再手術日等の診療情報を対象とした。被験者がウイルス感染等をしていない場合、研究者も感染する危険性があるため、あらかじめインプラントの洗浄、滅菌を行った上で提供を受ける

こととした。なお、ポリマー製部品の変質を防ぐため、滅菌はエチレンオキサイドガス滅菌とした。

上記の内容で国立医薬品食品衛生研究所および大阪大学において倫理申請を行った。

## 2. 疲労特性評価法の確立

昨年度までに行った「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」において、ECT 試験での疲労特性評価の可能性が示された。ECT 試験は CT 試験片による疲労き裂成長試験をより簡素化し、抜去インプラントにも適用可能なようにしたもので、小さなサイズの試験片の片側に初期クラックを作製した Eccentrically cracked tensile (ECT) 試験片を使用する。しかし、試験中の試験片の塑性変形が大きく、疲労き裂成長試験で使用する応力拡大係数幅  $\Delta K$  による解析の妥当性に疑問があった。そこで、本研究では試験片の寸法を変えて試験を繰り返し、試験片寸法による影響について検討を行った。

材料は UHMWPE GUR1050 の成型体とした。試験片の寸法は 4x8x24mm を基本とし、厚みを変えたもの (3x8x24mm、6x8x24mm)、幅を変えたもの (4x6x24mm、4x10x24mm) を機械加工により作製した。試験片の片側にカッターで長さ約 1mm のクラックを作製した (図 1)。

疲労試験は油圧サーボ式疲労試験機 (株式会社島津製作所、サーボバルサー EHF-LV010K1-A10) を使用した。試験片の両端約 8mm をチャックし、最大荷重 280N から 640N、応力比 0.1、周波数 1Hz の正弦波の繰り返し荷重を加えた。試験は破断または 10 万サイクルで終了とし、終了後、デジタルマイクロスコープ (KEYENCE、VH-8000C) により初期クラックの正確な長さの計測を行った。また、走査型電子顕微鏡 (SEM、日本電子株式会社、JSM-5800LV) により破断面の観察を行った。ECT 試験片の K 値の計算は以下の式に従って行った。初期クラックがクラック成長方向に対して垂直でなかった場合は、両端および中央部の長さの平均値を初期クラック長とした。

$$K = (P/WD) (\pi a)^{0.5} F(x)$$
$$F(x) = (\beta^{-1} \tan \beta)^{0.5} (0.752 + 2.02 x + 0.37 (1 - \sin \beta)^3) (\cos \beta)^{-1}$$

ただし、

P: 荷重

W: 試験片幅

D: 試験片厚さ

a: クラック長

$x = a/W$

$\beta = \pi x / 2$

である。また、応力拡大係数幅  $\Delta K$  は、最大荷重時と最小荷重時の K の差であり、



Pmax : 最大荷重  
Kmax : 最大荷重時の K 値  
Kmin : 最小荷重時の K 値  
とすると、

$$\Delta K = K_{\max} \cdot K_{\min}$$

であるが、本研究では荷重比を 0.1 としたことから、

$$K_{\max} = (P_{\max}/WD) (na)^{0.5} F(x)$$

$$K_{\min} = (0.1P_{\max}/WD) (na)^{0.5} F(x)$$

であるから、

$$\Delta K = 0.9K_{\max}$$

である。

## 6. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発

FDA のオンライン対話型検索<sup>10)</sup>では、検索スピードは速いが、1996 年の 7 月末の企業報告の制度的開始を境にして 2 つに分かれていること、また複雑な検索や集計は困難であること、から、従来通り、ファイルをダウンロードし、それらを Access 形式に変換してデータベースに再構築後、機器の種類(機器の分野、クラス分類、implant の有無、機器の一般名)、及び不具合(不具合の種類、健康被害状況、回収状況)ごとに分類し、時系列に追うことで、不具合の傾向を掴むこととした。データを Excel 形式に変換した後、専ら、年と各項目とのクロス集計表を作成して解析を行った。

今年度は、心臓血管系を中心に取り上げ、その中でも頻出する不具合、及び機器分類をリストアップすると共に、注目すべき個別分類機器、個別不具合について解析を行った。

## 7. 吸収性材料による長期生体影響(神経毒性)のリスクアセスメント手法開発

### 1) 実験動物

雄の Wistar 系ラット(オリエンタル酵母、東京)の 9-10 週令を使用した。ラットを control(手術のみを行う群)、実際の人工硬膜製品と同じ濃度の OT 含有ポリ乳酸ラクチド埋め込み群、高濃度 OT 含有ポリ乳酸ラクチド埋め込み群、高濃度 DBT 含有ポリ乳酸ラクチド埋め込み群の 4 群に分けた(n=10/群)。ラットはポリカーカーボネート製のケージに同じ群のラットと 2 匹ずつの組で飼われ、餌と水を自由に摂取した。飼育室の環境条件は 14 時間/10 時間の light/dark サイクルで、温度は 22℃、湿度は 45% であった。ラットは手術前、1 週間飼育室で慣らされた。動物の扱い及び処置に関しては、北里大学医学部動物実験・倫理委員会のガイドラインに従い、委員会ですべて許可を受けた。

### 2) ポリ乳酸ラクチド膜

製品と同じ濃度の OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜は、三重膜の構造をもった厚さ 300µm のもので、触媒としてのオクチル酸スズの濃度はスズ濃度で最大 20ppm であった。高濃度 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜は厚さは 300µm とし、残存スズの濃度を 200ppm としてテーラーメイドで作成した。高濃度 DBT 含有ポリ乳酸ラクチド膜は、同様に構造は三重膜で、厚さは 300µm とし、残存スズの濃度を 100ppm としてテーラーメイドで作成した。

三種類の膜ともに、清潔下に約 6.5mm 四方に切り出した後、角を切り落として八角形にして、埋め込み用試料とした。製品等量 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜の重量の平均値±標準誤差は 12.8±0.5mg、高濃度 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜の重量の平均値±標準誤差 14.3±0.3mg、高濃度 DBT 含有ポリ乳酸ラクチド膜の重量の平均値±標準誤差 14.1±0.6mg であった。

### 3) ラットへの手術の方法、観察期間

埋め込み手術時のラットの群別の平均体重±標準誤差は、control 371.7±5.3g、製品等量 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜埋め込み群 364.9±6.3g、高濃度 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜埋め込み群 375.8±5.0g、高濃度 DBT 含有ポリ乳酸ラクチド膜埋め込み群 369.2±4.5g であった。

ラットに腹腔内投与ネンブタール麻酔(ペントバルビタール 50mg/kg)を行い頭毛を剃り、脳定位固定装置(SR-6R, Narishige, 東京)に固定した。ラット用補助イヤバーは先端がとがっていないものを使用した。ラットの頭蓋骨を露出し、電動式手術器械(ドリルシステム) Osada Success 40M2(オサダメディカル、東京)を用い、内径 8mm のポントレフィンバー BTB-80(長谷川メディカル、東京)を用いて、頭蓋骨から、直径 8mm の円形の頭蓋骨片をくり抜いた。穴より、製品等量 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜か、高濃度 OT 含有ポリ乳酸ラクチド膜、または高濃度 DBT 含有ポリ乳酸ラクチド膜を頭蓋内に入れ、上からくり抜いた頭蓋骨片をかぶせた。control 群に関しては頭蓋骨片を戻した。骨膜及び皮膚を、針付きナイロン縫合糸 6-0 黒(河野製作所、市川)で縫合した。

手術後 4 週間、同じ群から 2 匹ずつ一つのケージに入れ、飼育した。ケージ毎の水、餌の摂取量を毎日測定し、ラットの体重も、行動学試験のためのハンドリングを兼ね毎日測定した。

### 4) オープンフィールド試験

手術の 4 週間後、Kobayashi et al. (2004)の方法を参考にオープンフィールド試験を行った。ラットは 1m 四方の白色のボックス(深さ 40cm)に置かれた。ラットを 30 分間動画で記録すると共に観察を行った。動画記録を専用の解析ソフト(Image Open Field 2.15r, 小原医科産業、東京)で解析し、総行動距離を算出した。最初に 3 秒以上のグルーミングを行った時点ま



での時間も計算した。また探索行動としてのrearing (壁に向かって行った場合のwall rearing 中心に向かって独立して行った場合のcenter rearing) の回数、情動性の測定のface washing (FW)の回数、body washing (BW)の回数、排便数、排尿数(残した糞または尿で判断)を記録した。以上を指標として、各群の平均値を算出した。

#### 5) Prepulse inhibition (PPI) test

オープンフィールド試験の翌朝、PPI test (Inada, et al., 2003, Kobayashi, et al., 2004) を行った。ラットは実験場所に移動後、約1時間慣らされた。使用器械はSan Diego Instruments製の小動物驚愕反応測定装置、Startle Response System SR-LAB ABS system (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA)であった。装置の驚愕反応チェンバーは、床面に電子秤を装備し、床面から24cmに音響刺激を発生するスピーカーが付いている。

ラットは円筒状のラットホルダーにセットされ、試験セッションが始まる5分前にチェンバーの中に入れられ環境に慣らされた(アクリメーション)。バックグラウンド音はアクリメーション、試験セッションを通じて、白色騒音65dBと設定した。試験セッションに関しては最初に40msecの120dBの単独音響刺激を5回繰り返した後、ランダムに、40msecの120dBのみ(P alone)、prepulseとして20msecの70dBか75dBか80dBの刺激があった80msec後の40msecの120dB刺激(それぞれPP70&P, PP75&P, PP80&P)、聴覚刺激を加えない場合を組み合わせた。刺激回数はP alone 11回、PP70&P 11回、PP75&P 11回、PP80&P 10回、刺激なし10回、計53回であった。最終的にP aloneの刺激の場合の動物が聴性驚愕反応を示した場合の電子秤の測定値の平均値と、PP70&P, PP75&P, PP80&Pについて測定した電子秤の測定値の平均値を算出し、以下の計算式により percent prepulse inhibition (%PPI)を計算した。

$$\%PPI \text{ at PP70} = (1 - PP70\&P/Palone) \times 100$$

$$\%PPI \text{ at PP75} = (1 - PP75\&P/Palone) \times 100$$

$$\%PPI \text{ at PP80} = (1 - PP80\&P/Palone) \times 100$$

#### 6) 試験後の脳の肉眼解剖観察

PPI test後、ラットを断頭により安楽死させた後、脳を摘出した。その際、頭蓋骨の状況を観察し、膜の回収を行い、また脳表面を観察した。

#### 7) 統計解析

餌、水の摂取量については、ケージ毎の値を元に各群の平均値を、それぞれの観察日について算出し、一元配置分散分析(ANOVA)で比較し、post hoc testにはFisherのPLSD法を用いた。ラット体重に関しても、手術後、観察期間、行動学試験実施時それぞれについて、群毎の平均値を算出し、同様に比較した。動

物処理時に膜を取り出し重量を測定し、吸収量を計算した。

行動学試験の評価にあたっては脳表面の観察により、脳の損傷の度合いが強いものは除外した。指標の平均値を算出し、行動学試験の各指標の群間の平均値をANOVAで比較した。

#### 8. コンピュータシミュレーションによる人工膝関節のリスクアセスメント手法開発に関する研究

有力なシミュレーション技術のひとつである有限要素法と人工膝関節の実形状を数値データとして表したCADデータを用いて、実際の動作を模擬する数値解析モデルを開発した。解析対象としたのは力学的に最も厳しい動作の一種である深屈曲である。計算効率を上げるためにCADデータの簡略化、軟組織の影響を表現するための非線形バネモデルの利用等を試みた。解析法の妥当性を検証するため、現行の新旧2機種並びに可動域を拡大することを目的として開発中の新型機種に対して適用した。

#### 9. 流体力学による脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメント手法開発

通常の医療画像装置の空間解像度は約200 $\mu$ m前後であるので、マイクロCT(島津製作所)を用いて、ステントの3次元形状再構築を行ったところ、細部の形状まで再現できることが分かった。このデータと脳動脈瘤の3次元形状データとをCADソフトにて結合させ、数値血流解析ができるようにした。

#### 10. コンピューターシミュレーションによる人工股関節のリスクアセスメント手法開発 場

臨床で実際に用いられている人工股関節ステムのCADデータから有限要素モデルを作成した。モデルA(HS62、日本メディカルマテリアル)は、平均的な体格の男性を対象として用いられている。モデルBは小柄な体格用に用いられているステム(HS-32、日本メディカルマテリアル)である。

ステムのサイズと形状が疲労強度に及ぼす影響を評価するために、2つのモデルについてサイズを以下のようにスケールした。

①モデルAのCT値をモデルBのCT値に合わせてステム全体を縮小：モデルA-2

②モデルAのステム径をモデルBのステム径に合わせて縮小：モデルA-3

③モデルBのCT値をモデルAのCT値に合わせて拡大：モデルB-2

④モデルBのステム径をモデルAのステム径に合わせて拡大：モデルB-3

元サイズのモデルと、スケールした4つの有限要素モデルの合計6種類についてシミュレーション

を行い、応力解析及び疲労寿命を推定・比較した。各モデルのステム材料はチタン合金 (Ti-15Mo-5Zr-3Al) である。有限要素モデルにおいて、拘束条件はISO7206-4 (2002年版) に準拠して、骨頭中心から 0.4CT 下部を基準として、それ以下を完全固定とした。荷重は骨頭中心を通る骨頭頂点に垂直下方向きに 5.3kN を与えた。有限要素解析は汎用有限要素解析ソフト ANSYS Workbench Ver.10.0SP1 (サイバネットシステム株式会社) を使用した。

## 1.1. ヒト単球由来細胞などによるアレルギーのリスクアセスメント手法開発

### ①細胞

THP-1 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、RPMI-1640 (GIBCO) 培地に 10% の fetal bovine serum (FBS) と 0.05mM の 2-mercaptoethanol と 1% の antibiotic-antimycotic を入れて共に培養した。実験には培養を始めて 2 週間後から 2 月内の細胞を用いた。

### ②添加剤の処理

添加剤は多木化学株式会社から提供されたものを使用した。皮膚感作性実験の陽性対照として使った 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB, Alderich) は Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma) に溶解し、stock solution をとして準備した。添加剤である G1, G2, G3, G4, G5, 6, 7, 8 はそれぞれ DMSO に解かして最高濃度の溶液を作製した。各最高濃度溶液から 2 倍濃度希釈系列で適切な溶媒に希釈し、それから RPMI-1640 の培地に各 stock solution を 50 倍希釈して working solution を作製した。各 sample で細胞を処理する際は、細胞浮遊液と同量の working solution を添加する。したがって、stock solution を最終的に 100 倍希釈濃度 (working solution) で細胞に添加した。

### ③flow cytometry 解析

THP-1 細胞浮遊液を平底 96 well プレートに  $3.2 \times 10^5$  (cells/80ul/well) で播種し各濃度希釈系列の working solution の 80ul を添加し、CO<sub>2</sub> incubator で 24 時間培養した。

培養後は V 型の 96 well プレートに細胞を移し、700 × g で 3 分遠心して細胞を回収した。FACS buffer (PBS+0.1%BSA) を使って 3 回洗い、200ul の 0.01% Globulins Cohn fraction II, III (Sigma-Aldrich) をプレートに入れて 4℃ で 15 分間ブロッキングを行った。700 × g で 3 分間遠心して上清液を捨てて anti-human CD86 antibody (BD pharmigen), anti-human CD54 antibody (DAKO) TITC labeled-mouse IgG1 (DAKO) を 50ul ずつ入れて 4℃ で

30 分間遮光状態で放置した。FACS buffer を用いて 3 回洗浄後、400ul の FACS buffer に細胞を懸濁し、細胞の表面抗原の発現レベルを DB FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて解析した。

### ④PI 染色による細胞の生存率

Flow cytometry での解析の直前に Propidium iodide (PI, 0.625ug/mL) を入れて、PI 染色による生細胞数の測定をした。生存細胞の総数が 10,000 個になるまで細胞を取り込んだ。陽性対照である溶媒のみの培地の生存率を 100% として細胞生存率を計算した。

### ⑤Relative fluorescence intensity (RFI)

生細胞を 10000 取り込み、抗 CD86、抗 CD54、抗 IgG 抗体の蛍光光度によって感作性の程度を評価した。④で説明した Flow cytometry の手順にしたがって実験した。RFI の値は CD86 あるいは CD54 の発現を指標として次のように算出した。

RFI (%) =	$\frac{\text{添加剤処理細胞の MFI} - \text{添加剤処理細胞の isotype control の MFI}}{\text{Control (溶媒) の MFI} - \text{Control (溶媒) isotype control の MFI}}$	× 100
*MFI = (geometric) mean fluorescence intensity.		

## 1.2. 医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

本年度は、相互作用検討を行う際に使用する細胞としてヒト単球由来の株化細胞である THP-1 が使用できるかどうかを検討した。炎症の指標としては、簡便に測定ができ、また phorbol ester 刺激による THP-1 からの産生が多く報告されている活性酸素を選んだ。まず、THP-1 からの活性酸素産生を確認すると同時に、その測定のための最適な条件を検討することを目的として、以下の 3 つの試薬を種々の濃度で添加した際の活性酸素産生量を測定した。

- 1) phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
- 2) lipopolysaccharide (LPS)
- 3) polystyrene microspheres (PS: 0.5μm 径)

THP-1 を PMA 0.1 μg/ml、活性型 vitamin D 0.1 μM、あるいはこれら両者を添加した FCS 10% を含有する RPMI 1940 培地 (RPMI-10FCS) で 24well マルチプレートに播種し、3 日間培養した。この処理で、本来浮遊細胞である THP-1 がマクロファージ様に分化し well 上に付着する。その後、PMA 及び活性型 vitamin

D を含まない RPMI-10FCS で所定時間培養した後に、種々の濃度で上記 3 種類の試薬を含有した 0.08 mM cytochrome-C Hanks Buffered Saline Solution (HBSS) 溶液中で 90 分培養して、試薬刺激に伴う活性酸素産生量を吸光度変化から算出した。刺激剤の添加濃度は

- ・ PMA : 0.1 -10  $\mu$ M
- ・ LPS : 0.1 -10  $\mu$ g/ml
- ・ PS : 0.25, 0.5, 1  $\mu$ g/ml

で検討を行った。

自己組織化膜を用いた各種官能基表面は、以下の方法で作製した。作製の基材には、マツナミ社製の円形カバーガラス (15mm 径、厚さ 0.1mm) に走査型電子顕微鏡観察試料調製用スパッタコーティング機器で金を 20nm 厚で蒸着させたものを使用した。

この基材を、エタノール中で片末端にチオール基、もう片末端に種々の官能基を持つ市販の decanethiol 類と反応させることで、特定の単一官能基からなる表面を調製した。市販品から調製できる官能基表面は 1) メチル基、2) カルボキシル基、3) アミノ基、4) 水酸基、の 4 種類である。また、acetonitrile 中、Ar 気相下で  $\text{POCl}_3$ 、2,4,6-collidine と水酸基表面試料とを反応させることでリン酸基からなる表面の調製を行った。さらには、DMF 中、Ar 気相下で DMF- $\text{SO}_3$  complex と水酸基表面試料とを反応させることで、表面への硫酸基導入を試みた。

### 1.3. ラットを用いたフラレーン(C60)の中樞神経への直接投与による脳機能への影響に関する研究動物

Wistar 系雄性ラット体重 400 g 程度を用いた。温度と湿度が調節された部屋(室温 24  $^{\circ}$ C、湿度 55%)、常時 12 時間ライト点灯、12 時間消灯)で、飼育した。試験前および試験測定中は、市販の精製固形飼料および、水道水を自由摂取させた。試験前日に、fullerene60 投与群と対照群に分けた。1 群を 6 匹とし測定を行なった。

#### フラレーンの側脳室への投与

ペントバルビタールを腹腔内投与し(3.5mg / 100g B.W.)、麻酔をかけ、頭部の毛をバルカンでかり、ステレオタキシク装置に頭部を固定した。頭皮を縦に 1.5~2.0cm 切り開き頭蓋骨を露出させ、止血剤(エピネフリン剤)で、完全に止血できるまでよく拭き、頭蓋骨を乾燥させた。止血後、Bregma および Lambda の位置を確認し、Paxinos と Watson らのブレインマップを参考にして側脳室の位置を定め(側脳室の位置は、Bregma-Lambda 間が 9mm の時、Bregma より右(左) 6mm、後方 1.4mm、Dura (硬膜)より深さ 4.0mm とした。Bregma-Lambda 間が

9mm でない時は、上記の位置を比例計算し、ポジションを決めた)、歯科用ドリルで頭蓋骨に穴をあけ、Dura より深さ 3.5mm の位置にマイクロシリンジを挿入した。マイクロシリンジポンプを用い、1mg/rat になるように fullerene60 を注入した。注入した fullerene60 は、人工脳髄液に懸濁し注入した。対照群には、fullerene 投与群と等量の人工脳髄液を注入した。

#### 自発行動測定試験

open field test を行なった。Open field box (70 $\times$ 70 $\times$ 50height) にラットを入れ、5 分間の行動距離を測定した。測定は、DV-Track ビデオ・トラッキングシステム CompACT VAS/DV (MUROMACHI) により記録した。手術の翌日、1、2、3 週間後の計 4 回の測定を行った。

#### 神経伝達物質濃度測定

行動試験終了後、断頭により速やかに屠殺し、脳を摘出した。視床下部を分離し、液体窒素により速やかに凍結し、測定まで -80 度で保存した。組織の 10 倍量の 0.2M 過塩素酸を加え組織をホモジナイズし、1 時間 4 $^{\circ}$ C で放置したのち、卓上遠心機を用い遠心分離により上清を得た(4 $^{\circ}$ C、10,000rpm、15min)。上清に 5 分の 1 量の 2 M 酢酸を加え、0.45 $\mu$ m のセルロースフィルターでフィルターレーションし、測定用サンプルとした。測定は、高速液体クロマトグラフィーにて行なった。カラムは ODS 逆層カラム、作用電極 Gc-Ce、電圧+650mV、電化検出器 (Eicom)、移動相はクエン酸酢酸バッファーを用いた。

### C. 研究結果

#### 1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

##### (1)スルホン化プレートの物理化学的性状

###### 1-1. XPS 解析による表面元素組成分析

細胞培養用プレート表面のスルホン化度を評価するため、未処理及び種々の時間スルホン化処理を施したプレート表面の XPS 解析を行った。未処理プレートの XPS 解析においては C1s 及び O1s に由来する 2 つのピークが観測されたが、240 分間スルホン化処理を行ったプレート表面からはこれら 2 つのピークに加え、S2p と Ca2p に由来するシグナルが確認された。

スルホン化時間とプレート表面へのスルホン基の導入量との相関性を表 1 に示した。10 分間のスルホン化処理により、プレート表面には重量比として 5.32% の S 原子が導入された。また、スルホン化処理による S 原子の導入量は 240 分まで処理時間に比例して増加することが確認され、240 分処理時の S 原子導入量は 15.6% に達

することが明らかになった。しかし、240分以降は飽和状態に至り、S/C比の増加は認められなくなった。

## 1-2. 静的接触角の変化

医用材料の生体適合性を評価する一手法として、スルホン化処理に伴うプレート表面の静的接触角の変化を追跡した。未処理プレート表面の静的接触角は57.0度を示した。一方、スルホン化プレートの静的接触角は処理時間の延長に伴い低値を示すことが確認され、240分間の処理を施したプレート表面の静的接触角は34.7度まで低下した。

## (2) ヒト正常骨芽細胞に対するスルホン化プレートの機能評価

### 2-1. 細胞増殖能に対する影響

ヒト正常骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養した際の増殖度の変化を生細胞測定用試薬であるTetraColor ONEを用いて評価した。骨芽細胞は培養期間の延長に伴って増殖することが確認されたが、20分、60分及び240分間スルホン化処理したプレート上での増殖度は対照プレートと同様であり、スルホン化の有無及びスルホン基導入量の相違に基づく細胞増殖度の違いは認められなかった。

一方、画像解析により1ウェル当たりの細胞数を核数として実測した結果、培養1日目の実細胞数は対照及びスルホン化プレートともに大きな差異が認められなかったが、2日目以降ではスルホン化時間に比例して増殖率が低下することが確認された。

### 2-2. 細胞分化能に対する影響

骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養した際の分化能の変化を評価した。ヒト正常骨芽細胞の初期分化マーカーであるALP活性を測定した結果、培養2日目までは対照及びスルホン化プレートともに大きな変化が認められなかったが、培養4日目以降における同活性はスルホン化処理により上昇することが明らかとなった。

オステオカルシンの測定結果、20分間スルホン化したプレート上で培養した骨芽細胞のオステオカルシン産生量は対照と同等であったが、60分間スルホン化処理したプレート上で培養した骨芽細胞では、培養4日目からオステオカルシン産生量が顕著に上昇した。また、240分間スルホン化処理したプレート上で培養した骨芽細胞では比較的早期にオステオカルシンの産生誘導が起り、培養2日目から産生量が有意に増加することが確認された。

最終的な分化マーカーであるCa産生量を測定した結果、培養4日目までは大きな差異がなかったが、培養7日目ではスルホン化処理時間に比例して顕著に上昇することが確認された。

### 2-3. 細胞の形態変化

ヒト正常骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養した時の細胞形態について、In Cell Analyzer 1000 Workstationソフトウェアを用いて、細胞当たりの平均面積を解析した結果、培養1日目においては大きな変化が観察されなかったが、培養2日目以降はスルホン化処理時間に比例して平均面積が増加する傾向が認められた。また、In Cell Analyzer 1000 Developer Toolsソフトウェアを用いて解析した細胞当たりの平均骨格長(μm)も平均面積と同様に変化し、スルホン化処理時間に比例して増加する傾向があることが確認された。

### 2-4. 作用機構の解析

未処理プレート上で培養した骨芽細胞の遺伝子発現パターンを対照として、スルホン化プレート上で培養した同細胞の遺伝子発現状況を検討した。本実験では、対照に対するサンプルの変動を培養時間毎に解析したと共に、培養2時間目の遺伝子発現パターンに基づいて対照内及びサンプル内の変動も追跡し、発現量が2倍以上又は0.5倍以下に変動した遺伝子を抽出した。これらの遺伝子中、比較グループ毎に変動率の大きい上位各100個の遺伝子を選択した後、成長因子に関連する119個の遺伝子を抽出し、その変動パターンを解析した。

スルホン化プレート上で培養した時に対照と比較して発現量が上昇する遺伝子群について、初期に発現するTIS-11ファミリーの1つであり、成長因子に対する応答を制御する機能を持つZFP36L1の発現量が培養開始後2時間目に顕著に上昇した。同遺伝子はホルボールエステルTPAやEGFのようなアゴニストを誘導する機能を持ち、培養開始後8時間目及び1日目にEGFとERBB2遺伝子の発現が上昇した。IGFBPファミリーの1つであり、IGFと結合することにより同成長因子の寿命を延ばし、細胞表面上にあるレセプターとの相互作用を変化させる機能を持つIGFBP4遺伝子の発現量も培養開始後2時間目に顕著に上昇した。IGF関連遺伝子として、IGFBP7とIFG2の発現量が、それぞれ8時間目及び1日目に上昇した。また、IGF1R遺伝子は培養時間の経過に伴い発現量が低下するが、その発現量はスルホン化プレート上で培養することにより保持されることが確認された。また、IGF1の作用を仲介する細胞質内シグナリング分子をコードするIRS2遺伝子の発現も対照と比較して保持されていた。増殖抑制因子として機能するTGF-β関連遺伝子としては、ACVR1C、TGFB2及びTGFB3遺伝子の発現量が8時間目から1日目にかけて上昇し、BMPやTGF-βスーパーファミリーのメンバーであるGDF5及びGDF15がそれぞれ4時間目と6日目に上昇した。その他、VEGFチロシンキナーゼレセプターの膜結合型コレセプターをコードするNRP1遺伝子も早期に誘導されていたと共に、転写活性化因子として機能し、成長因子により活性