

化される STAT2 遺伝子の発現量も培養開始後 4 時間目に上昇していた。また、CTGF に属する Wnt1 inducible signaling pathway protein をコードする WISP1 遺伝子の発現も 8 時間目に上昇した。

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減少する遺伝子群を表 4 に示した。細胞の分裂促進機能や生存活性を持つ FGF1、FGF2 及び FGF5 遺伝子は培養開始後 4 時間目から 8 時間目にかけて発現量が顕著に低下した。また、TGF- β 関連遺伝子は培養初期に発現量の増加が見られたが、TGFBR2 は 1 日目、TGFBR3 は 3 日目に発現量が低下した。

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変化しない遺伝子群を表 5 に示した。多くの TGF- β 関連遺伝子の発現量は培養初期に増加し、培養中期に減少したが、TGF- β の II 型受容体とコンプレックスを形成する TGFBR1 遺伝子はその発現量に変化が認められなかった。その他、骨形成に関与する BMP のレセプターファミリーの 1 つである BMPRII 遺伝子やヘパリンが結合した成長因子のコレセプターとして作用する SULF1 遺伝子なども発現量が変化しなかった。

(4) 毒性評価

スルホン化プレート上で培養した CHL/IU 細胞の染色体異常試験の結果、同細胞に観察された染色体の構造異常の種類と数及び倍数体の数は未処理（対照）プレート上で培養した細胞と同等であり、スルホン化プレートは CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性を示さないことが確認された。また、スルホン化プレートは CHL/IU 細胞に対して細胞毒性を示さないことも明らかになった。

一方、通常、CHL/IU 細胞は細胞が密集したコロニーを形成するが、スルホン化プレート上では各細胞が分散して増殖することが確認された。また、個々の細胞サイズに大きな差異はないが、スルホン化プレート上で培養した場合、巨大細胞の発現頻度が若干上昇していた。

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. 予備細胞毒性試験

各材料について、培地懸濁、乾式および湿式粉碎の 3 種の分散液を調製し、CHL 細胞を処理した。その結果、細胞毒性が分散液調製法による影響を強くうけるもの（例：sample 2）から、ほとんど影響を受けないもの（例：TiO₂, NH₄Cl, NH₄OH）まであった sample 2 の実際のプレート上でのコロニーおよび高濃度での材料の付着の様子を示す。また、参考材料クリソタイル B では、調製法による差は認められなかったが、他の全ての試験試料とは大きく異なる強

い細胞毒性を示した。

2. 細胞毒性と粒子径の比較

細胞毒性試験と平行して粒子径測定を実施した材料の結果を示す。粒子径測定に DLS-7000 を使ったが、まだ、分散方法が適切ではなく、目視できるくらい大きな粒子が残っており、DLS-7000 では正確に測定できていない可能性が示唆された。絶対値としての粒子径を記載することは、困難と考えられるが、相対的にどちらの粒子径分布の方が大きいかは比較できると考えている。Sample 1 と sample 2 では、培地懸濁したものと湿式粉碎したものとを比較したが、いずれの材料も後者の方が粒子径が小さくなっており、培地懸濁よりも細胞毒性は強くでていた。その他の 4 種の材料については、超音波処理の時間の長短で比較したが、粒子径に大きな差はなく、それらを使った細胞毒性試験でも、超音波処理の長短による差は認められなかった。

3. 蛍光標識ビーズの細胞内への取込み

ナノマテリアルを含め不溶性の微粒子を細胞に処理した時、各試験系でそれぞれの指標が観察されるが、この時ナノマテリアルが細胞内部に取込まれているか否かを確認する必要がある。観察された指標がナノマテリアルが外部から細胞を物理的に刺激することによって誘発されたのか、細胞内に取込まれた結果、誘発されたのかを確認するためである。通常の蛍光顕微鏡では細胞とナノマテリアルの垂直方向の位置関係を観察することは困難である。そこで、招へい外国人研究者 Dr. Onfelt に共焦点顕微鏡による観察を分担してもらった。

細胞内への粒子取込みを確実に観察するために、細胞質を FITC（緑）、核および染色体を DAPI（青）で染色し、ビーズは赤色の蛍光で標識されているものを用いた。

細胞に付着してみえるビーズの数は処理時間とともに増加し、細胞の表面に乗っているものから、一部細胞膜に埋もれて見えるものまで様々であった。

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. デジタル顕微鏡観察

純金属である Ti、Zr、Nb 及び Al のハンクス平衡塩溶液浸漬後のデジタル顕微鏡観察像を図 1 に示した。Ti 及び Zr 表面では、どちらも長軸と垂直な方向に走る研磨痕に沿って、薄い析出物が観察された。一方、Nb 表面では析出物は観察されず、研磨痕がはっきりと確認できた。また、Al 表面ではスポット状に析出物が観察され、肉眼でも観察される程大きな析出物も一部に見られた。

Ti-Zr基合金のハックス平衡塩溶液浸漬後のデジタル顕微鏡観察像では、Ti-Zr表面において研磨痕に沿って析出物が観察された。Ti-Zr-4Nb表面でも研磨痕に沿って析出物が観察されたが、Nb含量の増加と共に析出物が少なくなる傾向がみられ、Ti-Zr-24Nb表面では析出物は観察されなかった。

2. 走査型電子顕微鏡観察

ハックス平衡塩溶液浸漬後にAl表面で観察された析出物を走査型電子顕微鏡で観察した。直径0.3-1 μm程度の球状結晶体が積み重なって大きな塊を形成しており、擬似体液中で形成する結晶性の低いアパタイトに特徴的な構造を示していた。

3. フーリエ変換赤外光音響分光分析

ハックス平衡塩溶液浸漬後のAl表面及び未焼成ハイドロキシアパタイト（宇部マテリアルズ）のFT-IR/PASスペクトルをに示した。Al表面に形成された析出物のスペクトルには、HApのスペクトルに認められる水酸基及びリン酸基によるピークの他に、炭酸基によるピークも認められ、この析出物は擬似体液中で形成する骨類似アパタイトであると同定された。

ハックス平衡塩溶液浸漬後のTi-Zr、Ti-Zr-8Nb及びTi-Zr-24Nb表面のFT-IR/PASスペクトルでは、Ti-Zr表面ではハイドロキシアパタイト類似のスペクトルが観察されたが、Ti-Zr-8Nb表面ではピーク強度が減少し、さらにTi-Zr-24Nb表面ではピークがほとんど観察されなかった。ハックス平衡塩溶液浸漬後のTi-Zr基合金におけるリン酸基による1050 cm⁻¹付近のピーク強度を図7に示した。ハックス平衡塩溶液浸漬後のTi-Zr-Nb合金表面のリン酸基は、Nb含量の増加に従って減少した。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

SNP タイピング、29SNP を行う。

今年度は、国立医薬品食品衛生研究所及び大阪大学医学部にてそれぞれの倫理審査委員会へ申請し、現在審査中であるため、患者血液由来のDNAを用いたSNPタイピングを行う事ができなかった。両機関の倫理審査委員会での承認が得られ次第、解析を開始する予定である。

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

国立医薬品食品衛生研究所および大阪大学にて研

究倫理委員会の承認を得た。これを受けて現在までに5例の抜去インプラントの提供が行われた。このうち最初の2例では、インプラントがビニル袋に密閉包装されていたため、滅菌の有無が確認できなかった。そこで、滅菌の有無が確認できる包装（滅菌袋）への変更を依頼した。現在までに提供されたインプラントの数が少ないため、まだ分析作業には入っていない。

2. 疲労特性評価法の確立

試験中の試験片の写真を図2に示す。き裂先端は鈍化しており、大きな塑性変形がおきていることが示唆された。試験後の破断面の光学顕微鏡写真を図3に示す。図の左側に示す初期クラックの範囲は容易に識別可能であった。き裂の伸展方向（図中では右方向）に向かって、次第に試験片の厚みが減少していることがわかった。破断面の電子顕微鏡写真を図4から図6に示す。いずれの図においてもき裂の伸展方向は左から右である。電子顕微鏡写真でも初期き裂の識別は容易に可能であった。き裂が伸展した部分では、菱形状の模様や破断時の塑性変形を示すさざなみ状の模様、き裂の伸展と垂直方向に並んだストライエーション様の模様などが観察され、いずれもCT試験片を用いた疲労き裂成長試験の破断面と同様の特徴を示していた³⁻⁷⁾。

図7に今回の試験結果を応力拡大係数幅 ΔK で整理した結果（K-N線図）を示す。縦軸は試験片寸法と初期クラック長さ、荷重から計算された応力拡大係数幅 ΔK であり、横軸は破断までのサイクル数 N で、対数目盛りになっている。また、10万サイクルまでに破断しなかった試料は中抜きで示している。寸法の異なる全試験片の結果を一つに示した。また、昨年度までに行った試験片による試験結果（試験片寸法は4x8x24mm）もあわせて示した。なお、き裂の伸展速度 da/dN がパリスの法則

$$da/dN = c (\Delta K)^m \quad (c, m \text{ は定数})$$

に従うと仮定した場合、 ΔK と N の関係はほぼ累乗近似に従うことが数値計算で求められたため、10万サイクルまでに破断したサンプルについて、累乗近似による近似曲線と R^2 値をあわせて示した。

K-N線図では、10万サイクルまでに破断した試料と破断しなかった試料で ΔK 値が逆転している例が多くみられ、また、破断した試料における ΔK と N との相関も低かった。この原因として、図2に見られたき裂先端の鈍化や図3に見られるような試験片の塑性変形が考えられた。応力拡大係数は線形破壊力学に基づいたパラメータであり、大きな塑性変形が生じるような条件では適用できない。そのため、K-N線図ではよい相関が観察されなかったと考えられた。

そこで、公称応力 σ と破断までのサイクル数 N で再度整理を行った。この結果 (S-N 線図) を図 8 に示す。試験片の断面積から初期クラックの面積をひいた面積で最大荷重を割ることにより σ は求めた。その結果、10 万サイクルまでに破断した試料と破断しなかった試料で σ が逆転している例は殆ど見られず、また、 σ と N の相関も高かった。

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

【不具合報告のデータベース化】

データは、不具合マスター (MDR: 912,265 件)、機器情報 (Device: 919,192 件)、患者情報 (Patient: 915,739 件)、不具合内容 (Problem: 409,717 件) などが、別々のデータになっており、さらに時期別に分けられていた。そのため、全てを結合させて、大容量のデータベースとした後に、機器のクラス分類の情報を付加し、報告された日付から年を切り出して、年別推移を得ることが可能になるようにした。さらに解析を容易にするために、解析に必要なデータのみを抽出して、再加工した。また、埋植されたか否かの情報を基にして implant された機器を抽出した。

単独機器による報告は、905,991 件 (99.4%) であり、2 機器によるものは 3,680 件、3 機器: 806 件、4 機器: 281 件、5 機器: 113 件などであった。複数機器報告については、同一機種でシリアル番号が異なるものが複数件あった時に一括して報告する場合などが該当する。最大で 35 機器をまとめて報告しているケースもあった。

報告された患者数は 915,739 名で、MDR 報告件数としては、912,244 件であり、内、2,469 件 (0.27%) に複数の患者 (機器も複数と思われる) が関与していた。さらに、553 件が 3 名以上のケースであり、最大で 48 名をまとめて報告しているケースもあった。

MDR 報告データと Device データから、MDR Key (MDR 報告での各報告に特有の番号であり Device データにも付記されている) を連結キーとして、結合データベースを作成した。

機器の分野別やクラスの情報もクラス分類から入手できる。以下は、この結合データベース中、機器の分類 (一般的名称、及び分野 [Speciality Panel]) を付加することが可能であった 913,001 件について精査することとした。また、1996 年以降には健康被害の情報も記載されており、これらの情報も利用した。

【機器全体での不具合報告】

クラス分類情報を付加した結合データベースを元に、機器全体の報告数、及び implant 機器報告数を報告年別グラフにした。企業報告が導入された 1996 年の翌年に、集中的な報告に依るとされる増加によって 8 万件近くになっていたが、その後やや減少しつつも、2001 以降は徐々に増加して 2006 年には 10 万件を超えていた。implant 機器の総数は、335,485 件 (36.7%) であったが、implant 機器の年推移も総数と同様の傾向を示していた。

また、健康被害状況が記載されている 1996 年以降については、健康被害状況別の報告年別グラフも作成した。総数の推移では 2007 年に前年よりやや減少していたものの、健康被害を生じている報告の増加傾向は続いている。implant 機器では、健康被害を生じている報告の方が機能不良 (malfunction) よりも多くなっていた。

クラス分類報告比率においては、機器全体ではクラス 2 が大半であるが、implant 機器ではクラス 3 の報告が大半であった。

分野別比率においては、機器全体では、心臓血管系 ([CV], Cardiovascular, 27%) が最も多く、次いで、一般・形成外科系 ([GP], General & Plastic Surgery, 16%)、一般病院系 ([GH], General Hospital, 13%)、臨床化学系 ([CC], Clinical Chemistry, 9%)、消化器・泌尿器系 ([GU], Gastroenterology & Urology, 8.8%) 等であった。一方、implant 機器では、心臓血管系 ([CV], 42%) がやはり最多で比率も増え、次いで、整形外科系 ([OR], Orthopedic, 14%) が多く、眼科系 ([OP], Ophthalmic, 6%)、神経科系 ([NE], Neurology, 5%)、歯科系 ([DE], Dental, 5%)、耳鼻科系 ([EN], Ear, Nose, & Throat, 2%) が機器全体の際の比率より多かった。

分野別の推移をみると、心臓血管系の最近の増加傾向が顕著であった。implant 機器での整形外科系の報告数が 2007 年に減少してはいるものの最近増加傾向にある。

一般名別報告機器総数 (機器全体) では、「Hexokinase, Glucose」 ([CC], 4.1%、以下 [] 内は分野の略称を示す) の報告が最も多く、「Pump, Infusion」 ([GH], 3.9%)、「Pump, Infusion, Insulin」 ([GH], 2.1%)、「System, Test, Blood Glucose, Over The Counter」 ([CC], 2.0%)、「Glucose Dehydrogenase, Glucose」 ([CC], 1.5%) とともに、糖尿病関連の検査・治療機器での報告が目立つ。次いで、除細動器、ペ

ースメーカー関連の機器の報告が目立つ。腹腔鏡

「Laparoscope, General & Plastic Surgery」〔GP〕、2.8%)や縫合器「Stapler, Surgical」〔GP〕、2.4%)などの手術用の機器も多い。

implant 機器では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」〔CV〕、9.5%)、「Electrode, Pacemaker, Permanent」〔CV〕、7.3%)、「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」〔CV〕、5.1%)、及び「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter, With Cardiac Resynchronization」〔CV〕、1.6%)などの除細動器、ペースメーカー関連の機器の報告が多い。薬物放出型冠動脈ステント

「Stent, Coronary, Drug-Eluting」〔CV〕、5.8%)、及び冠動脈ステント「Stent, Coronary」〔CV〕、2.8%)、大動脈瘤ステントグラフト「System, Endovascular Graft, Aortic Aneurysm Treatment」〔CV〕、1.9%)などの血管系の機器の報告も目立つ。眼内レンズ

「Lens, Intraocular」〔OP〕、5.8%)の報告も多い。人工歯根「Implant, Endosseous, Root-Form」〔DE〕、4.6%)、及び人工乳房「Prosthesis, Breast, Noninflatable, Internal, Silicone Gel-Filled」〔GP〕、4.0%)、「Prosthesis, Breast, Inflatable, Internal, Saline」〔GP〕、2.9%)も総数としては多い。

機器全体の年別の推移を見てみると、最近になって「Hexokinase, Glucose」〔CC〕、「Pump, Infusion」〔GH〕の報告が激減し、変わって「Glucose Dehydrogenase, Glucose」〔CC〕、「Pump, Infusion, Insulin」〔GH〕が増加している。一方、腹腔鏡や縫合器の報告は漸減している。

implant 機器では、除細動器、ペースメーカー関連機器は伴に増加傾向であり、眼内レンズは波があるもののやや増加傾向である。人工歯根、人工乳房は減少傾向が続いている。冠動脈ステントは定常的に多く、薬物放出型ステントは報告も飛び抜けて多かったが、2007年に減少している。

【不具合内容】

一方、機器分類とは別に、不具合内容は825に分類(Code付け)され、総不具合内容数は409,717件になっている。このうち、不具合Codeと関連づけられたものは、409,672件であり、MDR報告数としては、286,666件(総数の31.4%)であった。Codeが付されたMDR報告1件につき、平均1.43Codeが付されていることになる。

1 Codeのみは192,528件(67.2%)、2 Codeは71,440件(24.9%)、3 Codeは18,696件(6.5%)、4 Codeは2,881件(1.0%)等であった。最大は34Codeで、17機器に2Codeずつ付されたものであった。複数Codeが付されたものは、単一機器に複数の不具合コードが付されたもの、単一機種 of 複数機器に同一の不具合コードが付されたもの、等であった。

前述した、結合データベース(913,001件)の内、MDR Keyの重複を除いた905,169件のデータを用いて、上記の不具合内容データ409,672件に機器の分類情報等を付加した。付加が可能であったものは405,682件(99.0%)であり、以下の不具合内容の集計はこのデータで行った。本格的にCodeが付されているデータは、1998年以降であり、2006年から急増している。

不具合別では、不明(6.6%)が最も多く、その他(4.7%)も多い。これらは、解析にはノイズとなるため、以降の解析からは省いた。その結果、359,951件での集計となる。

なお、以下の集計でのパーセンテージ(%)は、全不具合内容延べ数を総数とした場合の%であり、報告機器総数の中の不具合の%ではないことに留意されたい。年推移に関しては、集計に適する1998年以降のデータに基づいた。また、以下の集計では、implant 機器を区別せず、機器全体での集計とした。

分野別では、心臓血管系〔CV〕が多く、半数近くを占めている。次いで、整形外科系〔OR〕、一般・形成外科系〔GP〕、一般病院系〔GH〕、眼科系〔OP〕であった。心臓血管系が多いことは、年推移のグラフからも明らかであり、増加も著しい。整形外科系もやや増加傾向にある。

不具合内容としては、全体的には、摘出「explanted」(5.4%)、インプラント除去「removal of implant」(5.1%)、体内残留「Device remains implanted」(3.0%)などの埋植状況に関するものが最も多く、機器破損「Device breakage」(2.8%)、機器不良「Device failure」(2.7%)、高抵抗「Impedance, high」(2.4%)、漏れ「Leak(s)」(2.2%)、キャプチャー不良「Capture, failure to」(1.9%)等の不具合が続いている。

報告数の多い機器についての一般名別小計数をグラフに示した。implant 関係の報告が多いと伴に、心臓血管系の機器が多数を占めていることがここでも明らかである。また、年推移でも、埋め込み型注入器「Pump, Infusion, Implanted, Programmable」〔GH〕を除いた他分野の機器(グラフ中の点線で示す)が比

較的增加していないのにも関わらず、心臓血管系[CV]の機器(グラフ中の実線で示す)の増加傾向が顕著である。

【心臓血管系の機器の不具合】

不具合は機器の種類・用途によって、その内容も異なることから、今年度は報告数が一番多く、かつ増加傾向のある心臓血管系について精査することにした。

まず、機器の一般名別で整理すると、報告数の多い機器はに示すとおりで、除細動器、ペースメーカー関連は言うに及ばず、ステント、カテーテル、心臓弁が並んでいる。年推移を見ると、カテーテル類の増減は見られないものの、除細動器、ペースメーカー、冠動脈ステント(特に薬物放出型)は増加が著しい。なお、機械式心臓弁の報告は減少しているものの、生体弁では増加しつつあった。

一方、不具合内容に関しては、「Impedance, high」(4.9%)、「Capture, failure to」(4.1%)、「Oversensing」(3.6%)、「Battery, low」(3.1%)、「Pace, failure to」(2.9%)、「Noise」(2.5%)、「Shock, inappropriate」(2.3%)などの電气的不具合報告が他を圧倒している。また、撤去(Dislodged)(3.7%)、閉塞(Occlusion)(3.3%)、体内残留(Device remains implanted)、損傷(Damage, internal/external)、摘出(Explanted)、導線破損(Lead(s), fracture of)、バルーン破裂(Balloon rupture)等の報告も多い。どの不具合も増加傾向を示していた。

【心臓血管系の不具合内容(個別機器別)】

以下、個別機器別について解析を試みた。

○最も報告数の多かった埋め込み型除細動器

「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」『図2 3』では、「Impedance, high」(9%)、「Oversensing」(9%)、「Shock, inappropriate」(8%)、「Battery, low」(7%)が多く、これらは全て、電气的なものと考えられる。いずれも増加傾向が著しかった。なお、機器の故障に留まっている報告の中では、「Battery, low」が13%と一番多かった。

○ペースメーカー電極・導線「Electrode, Pacemaker, Permanent」では、「Capture, failure to」(12%)、「Impedance, high」(10%)、「Dislodged」(8%)、「Threshold, high」(7%)の順であり、いずれも増加傾向であった。なお、機器の故障に留まっている報告の中では、「Impedance, high」が14%と一番多かつ

た。

○ペースメーカー「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」では、「Capture, failure to」(8%)、「Pace, failure to」(7%)、「Output, none」(7%)、応答不良「Interrogate, failure to」(5%)の順であり、いずれも最近増加傾向『図2 6』であったが、2000年にピークが見られていた。特に「Output, none」はこの年に300件(総報告の26%)を超えていた。とはいえ、この年のこの機器の回収例はなく、回収までには至っていない模様である。なお、健康被害を伴った報告の中では、「Output, none」が8%と一番多かった。

○薬物放出型冠動脈ステント「Stent, Coronary, Drug-Eluting」では、「Occlusion」(44%)が圧倒的に多く、「Device remains implanted」、「Dislodged」などの埋植に関する報告の他に、「Fracture(s) of device/material」(4%)、「Bend」(2%)、「Damage, internal/external」(2%)などの機器の破損に繋がる報告もあった。年推移でも、「Occlusion」は継続して増加していた。なお、健康被害を伴った報告の中では、「Occlusion」がやはり58%と圧倒的に多かった。一方、機器の故障に留まっている報告の中では、「Bend」が9%で一番多かった。

○冠動脈ステント「Stent, Coronary」では、撤去「Dislodged」(22%)が圧倒的に多く、次いで「device, incorrect care/use of」(9%)、「Advance, failure to」、「Balloon rupture」と続いていて、「Occlusion」は5%足らずであった。

○埋め込み型除細動器「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter, With Cardiac Resynchronization」で顕著なことは、「Battery, low」(23%)が多いことで、年々倍増傾向も著しい。健康被害を伴った報告の中では14%、機器の故障に留まっている報告の中では27%であった。

○診断用血管内カテーテル「Catheter, Intravascular, Diagnostic」では、「Implant, removal of」(22%)が筆頭だが、「Device breakage」(16%)、「Fracture(s) of device/material」(7%)、「Leak(s)」(7%)

と機器の破損を生じている例も多い。しかし、「Fracture(s) of device/material」(2004~2006年の報告が殆ど)を除いては、2003年以前の報告が多く、最近減少傾向である。

○周辺血管形成術用カテーテル「Catheter, Angioplasty, Peripheral, Transluminal」では、

「Balloon rupture」(26%)、「Balloon burst」(23%)、「Removal difficulties」(9%)、「Source, detachment from」(6%)と機器の破損を生じている例も多い。年推移では変動が大きかった。機器の故障に留まっている報告の中では、「Balloon rupture」、「Balloon burst」とともに28%を超えていた。

○大動脈内バルーン「System, Balloon, Intra-Aortic And Control」は、減少傾向で最近は報告もわずかである。

○「Wire, Guide, Catheter」では、「Source, detachment from」(20%)が多く、「Wire(s), breakage of」(12%)、「Tip breakage」(8%)、「Removal difficulties」(8%)、「Device, incorrect care/use of」(7%)、「Device, or device fragments remain in patient」(5%)、「Device breakage」(4%)と、機器の破損を生じている例も多い。

○生体心臓弁「Tissue, Heart-Valve」では、弁傍リーク「Paravalvular leak」(26%)が圧倒的に多く、弁膜周囲リーク「Leak(s), perivalvular」(6%)も報告されている。「Explanted」(13%)、「Replace」(6%)の他にも、変敗「Deterioration of prosthesis」(11%)、弁の裂口・裂孔「Tears, rips, holes in device, device material」(6%)、癒合不完全「Incomplete coaptation」(5%)、石灰化「Calcification」などと生体弁に特徴的な項目が続いている。なお、弁の不具合に留まっている報告の中では、「Replace」が32%と多かった。年推移では、変敗(Deterioration)での最近の急増が目立つ。

○機械式心臓弁「Heart-Valve, Mechanical」では、「Explanted」(57%)、「Implant, removal of」(9%)、「Device remains implanted」(8%)などの埋植関係の報告が圧倒的であり、生体弁同様、「Paravalvular leak(s)」(4%)、「Leak(s), perivalvular」(3%)も報告されている一方で、ストラット(支柱)破損「Strut fracture」(3%)、弁開放不十分「Disc, incomplete opening of」(2%)などの機械弁に特徴的な不具合もあった。弁の不具合に留まっている報告の中では、「Disc, incomplete opening of」が19%と一番多く、ついで固着「Sticking」も16%と多かった。死亡例の中では、「Strut fracture」が16%と「Explanted」(45%)に次いで多かった。しかし、これらの報告も2000年代初頭までで、最近では報告数自体も非常に少なくなってきた。

【心臓血管系の不具合内容(個別不具合別)】

以下には、個別不具合内容別の解析について記述する。

○高抵抗「Impedance, high」では、除細動器「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(47%)とペースメーカー電極「Electrode, Pacemaker, Permanent」(38%)が双璧であり、両者ともに増加傾向を示していた。

○「Capture, failure to」では、「Electrode, Pacemaker, Permanent」(56%)が大半を占め、他も「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」(20%)と「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(19%)が殆どであった。年推移では、「Electrode, Pacemaker, Permanent」が最も増加傾向であった。

○「Oversensing」では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(62%)が大半を占め、次いで「Electrode, Pacemaker, Permanent」(20%)が多く、他も「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter, With Cardiac Resynchronization」(9%)と「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」(8%)が殆どであった。年推移では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」が最も増加傾向であった。

○閉塞「Occlusion」では、薬物放出型冠動脈ステント「Stent, Coronary, Drug-Eluting」(90%)が殆どであり、2番目の冠動脈ステント「Stent, Coronary」でも6%に過ぎなかった。一方、不具合に留まっている報告の中では、「薬物放出型冠動脈ステント」は32%であった。年推移でも薬物放出型冠動脈ステントの報告増加は著しいものがある。

○「Battery, low」では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(58%)と「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter, With Cardiac Resynchronization」(33%)で占められていた。両者共に増加傾向であった。

○「Pace, failure to」では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(34%)と「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」(24%)が大半を占めていた。年推移では、全体的に増加傾向であった。

○「Shock, inappropriate」では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(82%)が殆どであった。年推移でも、急増していた。

○「Device breakage」では、「Catheter, Intravascular, Diagnostic」(27%)と「Catheters,

Transluminal Coronary Angioplasty, Percutaneous」(16%)のカテーテル類が最も多く、次いで止血機器「Device, Hemostasis, Vascular」(12%)が多かった。ステント類の報告も多かった。年推移では、2000～2002年の報告が多く、最近はその機器においても40件を下まわっていた。

○「Balloon rupture」では、周辺血管形成術用カテーテル「Catheter, Angioplasty, Peripheral, Transluminal」(31%)、冠動脈形成術用カテーテル「Catheters, Transluminal Coronary Angioplasty, Percutaneous」(23%)、大動脈内バルーン「System, Balloon, Intra-Aortic And Control」(22%)が主で、「Stent, Coronary」(11%)、「Stent, Coronary, Drug-Eluting」(3%)が続いていた。冠動脈形成術用カテーテルの増加傾向が大きく、2007年では他の倍以上であった。健康被害を伴った報告の中では、大動脈内バルーンが50%と多かった。一方、不具合に留まっている報告の中では、周辺血管形成術用カテーテル(44%)と冠動脈形成術用カテーテル(33%)が多かった。

○導線の破損「Lead(s), fracture of」では、除細動器「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(50%)とペースメーカー電極「Electrode, Pacemaker, Permanent」(49%)が殆どを占めていた。除細動器の報告増加が目立ち、2007年にペースメーカー電極の報告数を倍以上、上回っている。不具合に留まっている報告の中では、ペースメーカー電極が87%を占めていた。

【心臓血管系の不具合(回収)】

回収が記されている報告(心臓血管系全体では6,215件)を機器別に集計してみると、除細動器「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(32%)、ペースメーカー電極「Electrode, Pacemaker, Permanent」(25%)、ペースメーカー「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」(23%)、診断用血管内カテーテル「Catheter, Intravascular, Diagnostic」(16%)が多く、他は1%以下であった。尤も、ペースメーカー電極以外は2007年のものが殆どで、ペースメーカー電極は、1998～1999年に多く、最近はやが回収されていない。

不具合の内容別に集計『図50』してみると、「Battery, low」(9%)、「Electrode(s), fracture of」(9%)、「Oversensing」(6%)、「Impedance, high」(6%)、「Shock, inappropriate」(4%)等が多かった。尤も、

上記の内、「Electrode(s), fracture of」以外は2007年のものが殆どで、「Electrode(s), fracture of」は、1998～1999年に多く、最近はやが回収されていない。なお、上記の「Electrode(s), fracture of」の不具合での回収は全てペースメーカー電極に起因するものであった。

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) 埋め込み手術後の経過及び実験終了後の脳の肉眼解剖所見、膜の変化

埋め込み後の各群の餌の摂取量について、ケージ毎の値から一日の摂取量の平均値を計算した結果では、観察期間全体にわたり群間で有意性を示さなかった。

埋め込み後の各群の水の摂取量についてもケージ毎の測定値を基に1匹当たりの摂取量の平均値を計算した。有意性を示したのは、投与後17日目の平均値±標準誤差 control 66.3±2.6g、製品等量OT含有膜埋め込み群77.1±4.3g、高濃度OT含有膜埋め込み群68.9±3.6g、高濃度DBT含有膜埋め込み群63.0±0.7gで、高濃度OT含有膜埋め込み群がcontrol及び高濃度DBT含有膜埋め込み群に比べ有意に高い平均値(対control; p=0.026、対高濃度DBT; p=0.006)を示した。他の日に関しては群間で有意性はなかった。

曝露期間を通じて、ラットの体重について、群間で有意性はなかった。オープンフィールド試験時の各群の体重の平均値±標準誤差はcontrol 476.0±12.6g、製品等量OT含有膜埋め込み群471.9±10.5g、高濃度OT含有膜埋め込み群485.0±8.1g、高濃度DBT含有膜埋め込み群467.4±10.9gであった。

行動学試験終了後の脳の肉眼解剖所見については、多くのラットで、大脳表面に骨の切り出しの円形に相当した痕が見いだされ、また、膜が脳表面に癒着したラットもあり、骨の切り出し(膜の形)に沿った脳皮質表面の痕が黄色様に変化し一部壊死している個体もあった。

そこで肉眼的に損傷が顕著と判断できる例を+とすると、+はcontrolではなかったが、製品等量OT含有膜埋め込み群2例、高濃度OT含有膜埋め込み群3例、高濃度DBT含有膜埋め込み群4例となった。これらは前年度同様、行動学試験の解析結果から除外することとした。結局、control 10例、製品等量OT含有膜埋め込み群8例、高濃度OT含有膜埋め込み群7例、高濃度DBT含有膜埋め込み群6例を行動学試験の解析対象とすることとした。

膜の状態については、頭蓋骨裏面で、薄い膜に挟まれている状態が多く、骨と骨に挟まれているとい

う訳ではなかった。動物処理時の膜重量については、製品等量OT含有膜の平均値±標準誤差が 9.4 ± 0.5 mg、高濃度OT含有膜 5.7 ± 0.6 mg、高濃度DBT含有膜が 9.9 ± 0.8 mgであった。膜の初期重量から計算した吸収量の平均値±標準誤差は、高濃度OT含有膜 3.5 ± 0.2 mg、高濃度DBT含有膜が 4.1 ± 0.7 mg、高濃度OT含有膜 8.5 ± 0.6 mgであった。こちらは群間で有意性は見られなかった。

2) オープンフィールド試験

オープンフィールド試験の移動距離 (A)時間区分別の移動距離、(B)観察期間全体の移動距離)の結果では、どの時間帯でも、総移動距離でも群間で有意性を示さなかった。

オープンフィールド試験における群別の(A) wall rearing, center rearing, FW, BW の回数、脱糞数、排尿数、(B)グルーミングの開始までの時間の平均値では、全ての指標に関して群間で有意な差はなかった。

3) Prepulse inhibition (PPI) test

PPI testの結果、%PPI at PP70、%PPI at PP75、%PPI at PP80について、群間で有意性を示さなかった。

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 東藤 貢 九州大学応用力学研究所准教授)

屈曲角度135度、内旋角度15度での脛骨インサート表面の相当応力分布状態から、ballとsocket部が接触することで応力集中が生じていることがわかる。また、断面での相当応力分布状態から、Socket部の厚さ方向に亘って応力集中が生じていることがわかる。このように、開発した数値解析法を利用することで、任意の屈曲角度での応力状態を可視化することができ、安全性の評価が可能となる。

次に、Stryker社の代表的2機種であるSuperflexとNRGの屈曲135度、内旋10度での相当応力分布状態をにおいて、SuperflexのPost部でより高い応力集中が生じていることがわかる。Post部における最大相当応力の推移から、Superflexに比べてNRGでは効果的に応力集中が低減されていることがわかる。また、Superflexでは内旋が10度加わると応力は増大するが、NRGでは内旋の影響はほとんど見られない。NRGはStrykerの後継機種であり可動性を向上させるためデザインの変更がなされているが、今回開発した解析モデルは、デザインの差が応力状態に与える影響を明瞭に示しており、有効性が示された。

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

ステントが設置された形状において計算メッシュ数は約2,300,000要素に達した。

脳動脈瘤ネック付近の血流を等高線図で速度を可視化した。ステント留置前、同ステントを留置した後の等高線は、ステント設置前後ではネックで、瘤内に流入する位置および流速がことなっていた。また、ステント設置することでネックの最大流速が減少していた。ステントを留置することで脳動脈瘤壁面近くの血流速度の低下が生じている。

ステント留置前に脳動脈瘤に生じている最大壁ずり応力値は 1.5 [Pa]であるが留置後は $0.4 \sim 0.25$ [Pa]程度まで減少していた。

ステントの留置位置によって脳動脈瘤への血流のエントリー位置が移動する可能性が示された。ステントを留置することにより、血流減少が顕著に認められた。また、壁せん断応力、血流速度を可視化し、数値化することができた。

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

有限要素解析および疲労シミュレーションによって、ステムの応力分布と疲労寿命推定を行った。応力として、ステム破損の実例として報告されているネック付近および拘束部位付近における最大主応力を評価した。5.3kN荷重を適用した場合におけるモデルAの疲労寿命推定結果は、モデルAをスケールリングして全体体積を小さくすると、疲労寿命が大幅に低下した。モデルBの疲労寿命推定結果を示す。モデルB-1とモデルA-3ではステム径が同じにも関わらず、ネックの疲労寿命はモデルA-3の方が短く、拘束部位での疲労寿命はモデルB-1の方が短い。モデルA-3はモデルBとステム径は同じであるが、CTが短い。すなわち固定部が短くなり、力学的な安定性が欠けたことが影響したものと考えられる。

一方、モデルB-2はモデルA-1と同じCT長さであるが拘束部位における疲労寿命がモデルA-1よりも低い。モデルB-2はモデルA-1とCTは同じであるが、ステム径は細いため、拘束部位での強度が劣るためと考えられる。これより、ステムの安定性を高めるためにCTを長くするだけでは不十分であることが示唆された。また、モデルA-2とモデルA-3のシミュレーション結果から、標準的体格に用いるステム形状を縮小させてステム径もしくはCTを調節しただけでは、疲労強度は向上できないことが示された。すなわちステムの力学的安定性を高めるためには、患者の体格に合わせたステム径とCT長さのバランスを求めることが重要となる。また、西洋人と東洋人では、大腿骨形状が異なり、東洋人の方が大腿骨の湾曲が大

きいため、特に小柄な女性の場合には標準体格用モデルのデザイン形状は適用できない。ステム径とCT長さをパラメータとしてステムデザインが疲労寿命に及ぼす影響について評価した。実験的手法では、こうしたデザインが及ぼす影響についての評価が困難であり、シミュレーションがこうしたパラメータ評価に対して有効である。

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

① PI 染色による細胞生存率

各添加剤と control は細胞生存率を三つの個別の well で評価した。陽性対照である DNCB が 5.2ug/ml では生存率に大きな変化なく、RFI 直が高くなるのが分かった。次に DNCB と溶媒(DMSO)のそれぞれが培養時間によって細胞の生存率に及ぼす影響を調べた。細胞の生存率は溶媒でも DNCB でも 24 時間までは変化がなく、48 時間後に DNCB において CD54, CD86 の発現が高くなったが生存率が 60%以下になった為、測定は 24 時間培養後に行うのが適切だと判断された。その結果から、添加剤が溶媒に溶解する最高濃度から 2 倍ずつ段階希釈して細胞生存率を PI 染色によって検討した。生存率はサンプルによって異なるが、すべてのサンプルで濃度依存的に生存率が下がる傾向が見られた。G4 の場合は最高濃度による細胞の生存率が低くなったので、細胞に対して強い毒性があることが考えられた。サンプル 6, 7, 8 は 2mg/ml では溶解しなかった為テストできなかった。

② CD86 と CD54 の発現

添加剤による感作性を検討する為、24 時間培養による細胞表面の CD86 と CD54 の変化を RFI 値で評価した。CD54 の発現はどの添加剤でも濃度依存的上昇したが、CD86 はむしろ発現が下がる結果を見られた。その結果から、添加剤は CD54 の発現に影響を及ぼすことが分かった。添加剤 G1, G3, G5, 6, 8 の場合は CD54 が RFI=200 になり添加剤の高い感作性が予想される。特に、添加剤 6 は 250ug/ml 濃度で 200 以上の発現が見られた。

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

予備実験として、活性化 THP-1 に PMA, LPS, PS を種々の濃度で添加した際の活性酸素産生量を cytochrome-c 溶液の 550 nm での吸光度変化から検討した。刺激剤濃度をいろいろと変化させ、また、3 種類の刺激剤を様々な組み合わせで加えて活性酸素の産生量を測定したが、いずれの場合においても cytochrome-c 溶液の吸光度変化は全く見られなかった。

金蒸着カバーガラスに各種試薬を用いて、4 種類の官能基を持つ表面をそれぞれ調製した。さらに、水酸基表面から硫酸基表面、リン酸基表面を合成し、これらの表面の接触角を Sessile drop 法で、表面に存在する元素を ESCA で測定した。この結果から、6 種類全ての官能基表面が調製できていることが示唆された。

これらの表面に、正常ヒト骨芽細胞を播種すると、細胞が接着伸展していることが確認されたが、メチル基表面では細胞は接着するもののその数が少なく、ほぼ全てが凝集して存在することが確認された。1 週間培養した後の細胞数を水溶性 MTT 試薬で確認すると、未処理の金表面と比較してメチル基表面ではその 10%程度、リン酸基及び硫酸基表面での細胞数は半分程度しか存在していなかった。

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影響に関する研究

Fullerene 60 を 1mg / rat (2.5mg / kg B.W.) で側脳室に投与した後に、ラットの体重の推移を測定した。Fullerene 投与群は、対照群に比べ手術後の体重減少が著しかった。対照群が術後 5 日で術前の体重まで回復したのに比べ、fullerene 投与群では、術前の体重に戻るまでにおよそ 12 日を要した。

自発行動量試験では、測定を行う 5 分間の、総移動時間、総移動距離及び平均移動速度を測定した。Fullerene 投与群では、手術の 1 日後のそう移動時間、総移動距離が対照群と比べ低い傾向を示したが、その他については、差は認められなかった。

脳視床下部のドーパミン濃度およびその代謝物濃度と、セロトニン濃度およびその代謝物濃度の測定を行った。Fullerene60 投与群の、ドーパミン及びその代謝産物である、DOPAC, HVA の濃度は、対照群と比べ差はみられなかった。セロトニンおよびその代謝物である 5HIAA 濃度は、fullerene60 投与群で、対照群と比べ減少した。

D. 考察

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

平成 19 年度の本研究では、細胞に対するスルホン基自体の影響を純粹に評価するための実験系を確立することを目的として、スルホン化プレートを作製すると共に、同プレート上でヒト正常骨芽細胞を培養した際の細胞機能の変化を経時的に評価した。

スチレン分子のスルホン化には、通常、濃硫酸のほか、発煙硫酸や三酸化硫黄ガスなどが使用されるが、本研究においては操作性及び安全性を考慮して濃硫酸を用いたスルホン化反応を選択した。細胞培養用プレートを構成するスチレン分子はオルト・パ

ラ配向性を示し、共鳴効果により芳香環のオルト位とパラ位の電子密度が増加し易い構造を持っている。一方、硫酸は以下に示すような平衡状態にあり、SO₃種が親電子試薬となることが知られている。ポリスチレンに濃硫酸を作用させると、反応機構に基づいてσ錯体を経て芳香族スルホン酸が得られる。

前述したとおり、芳香環のオルト位の電子密度も増加しているが、同部位ではポリスチレンの主鎖を形成するアルキル鎖との立体障害が生じるため、パラ位が優先的に修飾を受けるものと思われる。スチレン分子のパラ位がスルホン化された際の分子中に占めるS原子の重量比は理論的に17.4%と算出される。本研究において、ポリスチレン製プレート表面へのスルホン基の導入は240分間の処理により飽和に達したが、その際のS原子の重量比は15.6%であり、理論値と相関することが確認された。また、スルホン化時間の延長に伴うプレート表面の静的接触角の低下はスルホン基の導入により親水性が上昇することに起因する。これらの物理化学的性質から、本研究で作製したスルホン化プレートの表面には処理時間依存的にスルホン基が導入されていることが明らかとなった。

ヒト正常骨芽細胞をスルホン化プレート上で培養すると、平均細胞面積と平均骨格長がスルホン化処理時間依存的に増加する傾向があった。また、染色体異常試験と細胞毒性試験の結果は数値的には陰性であったが、同試験に使用したCHL/IU細胞のコロニー形態も顕著に変化した。これらの現象もスルホン基の導入に伴い、プレート表面の特性が変化したことに基づいているものと思われる。

TetraColor ONEを用いてWST-8法により測定した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、実細胞数を測定した結果、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。TetraColor ONEは生細胞内ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼ活性を利用して生細胞数を測定する比色定量法であり¹⁴⁾、原理上、生細胞数のほか、細胞活性の相違による影響を受ける。本実験において、スルホン化処理により増殖率が減少しているにも拘わらず、TetraColor ONEにより対照プレートと同等の増殖活性が観察されたことから、骨芽細胞の代謝活性はスルホン化プレート上で培養することにより顕著に上昇することが示唆された。

スルホン化プレートはヒト正常骨芽細胞の分化能を顕著に増強する作用を持つことが確認されたが、スルホン基自体が同細胞に直接的な影響を及ぼしているとは考え難い。前述のように、硫酸化多糖類はBMPs、FGFs、antithrombin IIIやGM-CSFなどと相互作用することにより細胞機能を増進させることが示唆されている

ことから、骨芽細胞の分化を促進するスルホン化プレートの機能も血清中に存在する何らかの蛋白質を介して発現されている可能性が高い。そこで、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、ヒト正常骨芽細胞の分化進行にはIGF、EGF、TGF-β、BMP、PDGFなどの成長因子が密接に関与していることが示唆された。また、培養初期においては、BCL-2蛋白質群をコードするBCL2L11遺伝子の発現量が上昇していたことから、アポトーシスが抑制されていることも示唆された。

現在、これらの遺伝子発現情報に基づき、IPAを使用したPathway解析を進めている。また、スルホン化プレートに吸着する蛋白質の同定作業や同プレート上で培養したヒト正常骨芽細胞の蛋白質発現解析も進めている。今後、遺伝子解析結果と相関する蛋白質が同定され次第、候補遺伝子を決定し、RT-PCRを用いた定量解析を実施する予定である。

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

sample 1からsample 4は、TiO₂から水熱合成したナノチューブである。合成後の洗浄処理の違いで、最終製品としての多層壁の間に残るイオンの種類が異なり、それが機能に影響を及ぼすのではないかと考えられている。その他、各種ナノマテリアルが開発されているが、ナノマテリアルは、製造時には、nm単位の一次粒子からなるが、手元に入手したものは白色または黒色の粉末で、μmレベルの凝集体となっている。今回の分散手技は、まだ未熟なものであるが、凝集体のサイズを小さくすることは容易ではないことを実感した。分散液を細胞に処理することを目的としているため、できるだけ分散剤を使わないで、むしろ物理的な手法で凝集体の粒子径を小さくしたいと考えている。分散剤自体の細胞毒性も試験しなければならないこと、また、ナノマテリアルと分散剤の複合効果が生じる恐れもあるからである。サイズの小さい安定した分散液の調製が優先課題であり、本研究のキーポイントであると考えている。

宮脇らは、NHAsの染色体異常試験をCHL細胞を使って実施している。1%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)溶液に懸濁して分散液を調製したことは記載されているが、分散液中の粒子の様子は記載されていない。また、濃度設定予備試験で、50%増殖抑制濃度が2.5 mg/ml以上であったとしている。本研究での、IC₅₀は、約0.4 mg/mlと推定できるが、試験法が異なるため、直接に比較はできない。宮脇らの染色体異常試験は2.5 mg/mlまで実施した結果、陰性と報告されている。今後、本研究でも1%CMC-Naでの分散液との比較も行ないたいと考えている。

粒子径だけでなく、分散液中の粒子の物理化学的

特性には、比表面積、形状、結晶型、表面活性、Z電位等があるが、いずれもその測定、評価には専門の知識を持った研究者が必要で、本研究では分野を横断した研究者の協力が必要であると考えられる。

毒性が観察された材料も、その構造等を修飾することによって同じ機能を持つ毒性の少ない材料を開発することは、工学分野の研究者には可能であると考えられ、正確な毒性を把握する事は、私達の健康を守るだけでなく、ナノマテリアルの開発を進め、日本の産業会の発展にも寄与するものと考えられる。

また、環境中での製品の劣化等により nm レベルの材料が飛散してもすぐに凝集することが予想され、安全性評価においても 100 nm サイズまでの粒子についての評価が行えればよいのではないかと考えている。従って次年度は、少なくとも 100 nm の粒子を含む分散液を調製することを目標としたいと考えている。

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

我が国の整形外科領域で使用されている医用材料は、重量ベースではCo-Cr合金が最も多く、次いでTi合金が多い。その他の医用材料は1割以下である。一般に金属は、骨組織との界面に軟組織が存在することが知られており、セラミックスのように骨組織と直接結合しない。そこで、骨の無機成分に類似したアパタイトコーティングや表面改質などにより、金属に骨と直接結合するような性質を付与する研究が活発に行われている。

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。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。擬似体液中でのアパタイト形成能は、生体内での骨結合性をよく再現できることも確認されている。

ISO 23317:2007で用いる擬似体液は、調製が複雑な上、作製した擬似体液の長期保存もできない。そこで、今回は市販の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を擬似体液として用いた。有機成分であるグルコースを含む点で、ISO 23317:2007で用いる擬似体液と大きく異なる。

ISO 23317:2007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。しかし、走査型電子顕微鏡では定量的な解析ができない。また、薄膜X線回折法で定量的に解析するためには試料形状が制限され、凸

凹がある試料では定量性が著しく劣る。そのため、ISO 23317:2007においても、試料形状が直径 10 ± 2 mm及び厚さ 2 ± 1 mmの円盤状、または、一辺 10 ± 2 mm及び厚さ 2 ± 1 mmの板状で、平滑な表面が要求されている。

フーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) は試料の前処理を必要としない非破壊的表面分析法であり、試料の形態にも制限がない。また、干渉計の可動鏡速度や変調周波数を変化させることで、深さ方向の分析も可能である。そのため、様々な形態の材料について、擬似体液に浸漬して表面にアパタイトを形成させたり、材料の上で骨芽細胞を培養して骨様石灰化物を形成させたりした後に、アパタイトの構造を完全に維持した状態のまま分析することができる。さらには、表面に形成したアパタイト量を正確に見積もった材料を、他の評価系の試料としたり、生体内に埋植したりすることも可能である。そこで、FT-IR/PAS法を用いて、材料表面に形成したアパタイトを定量するための基礎的な検討を行った。

ハッ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もハックス平衡塩溶液浸漬によってアパタイトを形成した。Ti、Zr及びTi-Zrはアパタイトを形成したが、いずれも形成量は少なく、FT-IR/PASで辛うじて検出可能な程度であった。今回用いた試料は、いずれもアルカリ・加熱処理などのアパタイト形成能を付与するための表面処理を施さなかったためであろう。

Nbを添加したTi-Zr基合金は、ハッ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。純Nbにおいてアパタイトが形成しなかった結果とよく一致した。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。

Ti-Zr基合金は、1~5 mol% のNbを添加すると、 α - β 二相組織が得られ、力学的強度が増し(13)、8 mol%以上のNbを添加すると、 β 単相組織が得られ、弾性率が小さくなる。このように、Ti-Zr基合金は、Nbの添加量で力学的性質を制御できるという特徴を有している。また、Ti-Zr-Nb合金に含まれているZrおよびNbは、合金の不動態皮膜中で安定な酸化物となって、不動態皮膜をより強固にする働きがあり、耐腐食性も向上する。

我々は今までに、Nbを添加したTi-Zr基合金について、チャイニーズハムスター由来線維芽細胞V79を用いた細胞毒性試験、正常ヒト骨芽細胞NH0stを用いた骨芽細胞適合性試験及びラット大腿骨への埋移による骨組織適合性試験を実施してきた。直接接触法によるコロニー法を用いた細胞毒性試験において、Nb含量にかかわらずTi-Zr基合金には細胞毒性が認め

られなかった。正常ヒト骨芽細胞NH0s1の増殖および分化に及ぼす影響を指標とする骨芽細胞適合性試験において、Nb含量にかかわらずTi-Zr基合金は骨芽細胞の増殖および分化を促進させた。また、骨芽細胞の分化レベルを、Nbを添加したTi-Zr基合金は増加させた。さらに、ラット大腿骨埋植試験を実施し、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、窩洞部の骨形成にも相違は見られず、骨組織適合性に問題は無いことを確認している。今後、アルカリ・加熱処理などの表面処理を施して、アパタイト形成能を付与できれば、安全性及び有効性の高い骨系医用材料として有望である。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

心臓弁膜症の治療の一つとして、現在人工弁置換手術が行われているが、人工心臓弁の機能不全は直ちに患者の生命を危機にさらす重大な問題である。機能不全の原因としてこれまでに血栓形成とパルス形成などが挙げられている。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために、置換手術後は抗血液凝固薬及び抗血小板薬を服用し続けなければならないが、服用していても機能不全につながる血栓が形成されることもある。それは個人の遺伝的背景の違いによって、薬に対する感受性の違いが見られるのかもしれない。また、パルス形成についてはその原因は未だ明らかにされておらず、血栓形成と同様な個体差による可能性も否定できない。

そこで本研究は、人工心臓弁の機能不全を未然に防ぐ方法の確立を目指して、血栓形成やパルス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た。人工心臓弁を現在使用している患者の血液を用いて、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、生体における免疫系、創傷治療や発癌など様々な環境下で重要な役割を果たしている TGF- β やそのレセプターなど 11 遺伝子を対象とし、計 29SNP を選択しタイピングを行うこととした。これまでの我々の研究からすでに日本人の健常人 (100 名) 由来の DNA を用いた上記 29SNP のタイピングデータはとってあるため、これを対照として比較検討する予定である。

今年度は、倫理審査等の手続きを進めており、承認され次第解析を開始する予定である。人工心臓弁の不具合の有無や原因 (血栓形成によるものかパルス形成によるものか等) によってアレルの頻度に差が出てくる SNP が特定できれば、血栓形成やパルス

形成による人工心臓弁機能不全の原因となり得る遺伝的背景を探る手がかりとなるであろう。人工心臓弁機能不全発症の分子メカニズムは未知であり、予防法も開発されていないため、今後遺伝子の多型を同定し、人工心臓弁の不具合発症との関連を調べることによって予防法の確立を目指していく。

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

1. 抜去インプラントの入手

大阪大学との連携により抜去インプラントおよびその診療情報の入手が可能となった。病院内において洗浄、滅菌することにより、分析中の感染リスクの問題が解決できた。今後、試料数が増加することにより、有用な情報が得られると考えられる。

2. 疲労特性評価法の確立

SEM による ECT 試験の破断面の観察結果では、CT 試験片による疲労き裂成長試験と同様の破断面の特徴が観察された。そのため、疲労き裂成長試験と同様の結果が得られることも考えられた。一方、試験中の試験片の写真や光学顕微鏡による破断面観察によると、き裂先端の鈍化や試験片の塑性変形が観察され、疲労き裂成長試験が前提とする線形破壊力学の適用が難しく思われた。本研究の結果、ECT 試験では破断までのサイクル数は公称応力とよく相関することがわかった。特に、試験片の寸法が小さいため、き裂の伸展方向に垂直の方向への塑性変形も許容することが原因ではないかと考えられる。

本研究では初期き裂の作製にカッターを用いた。一般的にき裂を作製して行う試験ではき裂先端の形状が試験結果に影響を与えるため、鋭いき裂の作製が求められる。例えば金属では、疲労によりあらかじめき裂を伸展させた上で試験を開始することが一般的である。プラスチック材料では、この方法が適用困難であることがあり、その場合はかみそり刃など、鋭利な刃物を使用することが推奨される。その理由は、き裂先端が鈍いとき裂の伸展が阻害され、正しい測定ができないためである。しかし、本研究で用いた UHMWPE では、き裂成長段階におけるき裂先端は、塑性変形のため鈍化することがわかった。つまり、初期き裂の先端はこのき裂成長段階におけるき裂先端よりも鋭ければ、試験結果に影響を与えないと考えられる。従って、カッターによる初期き裂作製でも問題がなく、試験片作製が容易である。

抜去インプラントやインプラント製品では、形状が一定でないため、高い精度での試験片の切り出しが難しい。しかし、本研究の結果、実験した範囲では試験片の寸法の影響は見られず、寸法精度が必要ないことがわかった。また、力学試験では、表面粗

さなどの表面性状が試験結果に影響を及ぼすことが少なくない。そのため、表面の研磨などを必要とすることがあるが、今回の試験方法では初期き裂を入れるため表面性状による影響が少なく、試験片を切り出した後に研磨などの工程を行わずに試験が可能である。

抜去インプラントの疲労特性評価に応用する上で、試料からの試験片の作製が大きな問題であるが、以上のように、極めて容易に試験片の作製が可能であり、有用な試験法であると考えられた。

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

今回、集計に用いたFDAの不具合データは、集計を目的としたものではないと明記されており、本研究はあくまでも報告者の責任において傾向を知るために解析を行ったものである。

実際の不具合解析では、個別の事例を精査することが本来の用途であり、数値解析はあくまでも1面的なものに過ぎないことを明記すべきであるが、傾向を知るには非常に有効な手段でもあることは事実である。

また、不具合報告が多い機器分類が、そのまま不具合の確率が高いということにはならない。実際の使用数が非常に多い可能性も十分にあり、一定の確率で不具合が起こるとすれば、必然的に報告数も多くなるからである。尤も、使用数の調査は中々難しく、また、implant機器の場合は、埋め込み時(使用時)と不具合の時期が異なる可能性があり、さらに比較が困難になってしまう。従って、今回の集計結果もあくまでも注意喚起のためであり、リスク評価の一環であることに留意する必要がある。

なお、埋め込み型除細動器、及びペースメーカーなどでは、医療機関で定期的に機器のチェックがなされているため、軽微であっても機器の不具合が見つかりやすいという傾向もあると思われる。

【不具合報告のデータベース化】

不具合マスター(MDR報告)には、1報告に複数の機器が含まれている場合があり、機器の数としては、919,192件で、これは、911,062件のMDR報告についてであった。従って、1,203件については機器情報が得られなかったのではないかと推察される。

また、結合データベースでは、1MDR報告に複数の機器が掲載された集計となるが、不具合対象の機器の数を反映したものとなるため、不具合評価により

適していると考える。

【機器全体での不具合報告】

健康被害状況別の年別グラフのimplant機器では、健康被害を生じている報告の方が機器の機能不良(malfunction)よりも多くなっているが、埋植用途であることから必然的なことと思われる。

クラス分類報告比率のimplant機器ではクラス3の報告が大半であったが、implant機器はクラス3が多いことによると思われる。

分野別比率のimplant機器においては、整形外科系ではimplant機器が多いこと、眼科系では眼内レンズの報告が多いこと、歯科系では人工歯根の報告が多いこと、などが全体比率より、これらの分野の比率が多い要因と考えられる。

分野別の推移で、全体、implant機器共に、1997年にピークが見られるが、1997年に機器全般に報告が集中した結果と思われる。

一般機器名別の総報告数では、糖尿病関連の検査・治療機器での報告が目立つ。機器全体の年別推移でも糖尿病関連の機器の世代交代が見て取れる。このように、全体の集計でも糖尿病関連機器の動静が分かるということは、如何にこれらの機器の報告(ならびに使用数)が膨大かを物語るものであろう。日本でも同様の現象が糖尿病治療機器で現れていることと考え合わせ、代謝疾患の蔓延をあらためて実感させられる。

implant機器において、眼内レンズは使用数の増加によって今後も増加してゆく可能性がある。薬物放出型ステントは急激な使用数の増加に伴い報告も非常に多かったが、不具合の周知も進んで報告もやや落ち着いた状態とも思われ、今後の推移を見てゆく必要がある。

一方、腹腔鏡、縫合器、人工歯根、人工乳房(新規使用が減少のため)、機械式心臓弁などは報告数としては減少傾向であった。

心臓血管系の機器では、埋め込み型除細動器、ペースメーカー関連機器、前述の冠動脈ステント、生体心臓弁での報告数の急増が顕著であった。使用数も増加しているとは思われるが、それ以上の増加が見られているようで懸念されるところである。

【不具合内容】

不具合Codeと関連づけられたものは、MDR報告全体の1/3以下に過ぎないが不具合リスクの評価と

いう意味では、不具合内容が明記されたデータを用いる他なく、やむを得ないところである。しかしながら、総数が多いことから、傾向を把握するには十分と考えている。

不具合内容データ、405,682件の内、implant 機器の割合は64%であり、implant 機器では、不具合 Code が付加されている割合が高いことになる。

不具合内容数の年別推移で2006年から急増しているのは、不具合の急増というより、企業からの報告書に不具合 Code 項目が付加されたためと思われる。従って、以下の解析においても、この急増による見かけ上の直近の増加傾向が現れている可能性も否定できない。

機器全体の不具合内容分野別では、前述した機器全体の場合より、implant 機器の場合に類似しているが、不具合 Code 付けが implant 機器に多かったことの反映とも考えられる。

不具合別では、電気関連の不具合報告の急増が懸念されると共に、薬物放出型冠動脈ステントの閉塞報告が急激に増加していることが最も懸念されることである。

【健康障害率】

仮に健康障害率を「健康障害(death+ injury) / [健康障害+機器機能不全(malfunction)]」のように定義すると、その比は機器全体では、52%であった。心臓血管系機器全体での健康障害率は57%であり、全機器よりやや高めであった。

本稿で取り上げた個別機器、及び個別不具合内容での健康障害率を各々示した。機械式心臓弁、及び生体弁での健康障害率の高さは群を抜いているが、心臓弁において健康被害を生じないで不具合のみに留まっているケースは、実際問題として少ないと思われる。ペースメーカーや埋め込み型除細動器は不具合を生じると健康被害に繋がりが容易と予想されるが、日常の定期点検で早期に不具合が見つかる場合が他の機器より多いためと思われる。また、最近の機器と思われるが、Resynchronization 機能を有した除細動器では健康障害率が31%と低い値であった。この機能が健康被害を予防する効果があるのか、単に健康被害に結びつかない「Battery, low」が非常に多かったことによるのか、は不明である。一方、薬物放出型冠動脈ステントの健康障害率が78%と高いのは、通常の冠動脈ステントの62%と比べると一目瞭然である。閉塞での健康障害率が99%であることと伴

に、最も懸念されることであった。他方、カテーテル類の健康障害率は比較的低かった。健康被害を及ぼす前に容易に撤去可能なためと思われる。

機器の破損に依るものとしては、導線の破損での健康障害率が88%と高い。導線の破損に対しては、健康被害を及ぼす前に対処することが難しいのであろうと思われる。

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

吸収性人工硬膜は頭蓋内で溶けて吸収されることから、特に触媒として使用されるDBT、OTの脳への曝露を起こす。臨床適用の前段階の毒性学的評価については課題が残っていた。

実際の手術を念頭においたモデルとして、ラットを用い人工硬膜を頭蓋内に埋め込み、一定時間経過した後に、評価を行ってきたが。過去の2年の研究から、膜が骨にサンドイッチになることを避け、かつ脳の過大な損傷を避けるために、頭蓋骨の切り出し直径を8mmと設定し、埋め込み手術を行った。

観察期間を通じて、餌の摂取量、体重について群間で平均値の差は見られず、また水の摂取量に関しても、高濃度OT含有膜埋め込み群の平均値がcontrolに比べて有意に高かったのは全観察期間中の1日のみであった。これは昨年度研究で高濃度OT含有膜埋め込み群の水の摂取量の平均値がcontrolに比べて全期間中で2日のみ有意に低かったのとは一致しない。以上から手術手技及び埋め込みの影響は、体重の変化や餌や水の摂取に影響を及ぼす程ではなかったと考える。

行動学試験終了後の脳表面の観察から、全ての群に切り出し部分と一致した痕が見られ、一部には痕部の黄変、壊死変化が見られた。以上から手術の手技としては問題があり、挿入した膜の厚さも損傷の程度に影響したと考える。一昨年度実験の5mmの場合は、脳の半球のみで手術が済んだため、出血は顕著ではなかったが、今回も昨年1cmの場合と同様、必然的にヒトの上矢状静脈洞に当たる部分を破らざるを得ない場合が多く、1cmの場合ほど顕著ではなかったが出血が起きた。但し、昨年度実験の脳の表面の損傷が大きくなかった数は、control 8例、人工硬膜埋め込み群5例、高濃度OT含有膜埋め込み群、高濃度DBT含有膜埋め込み群7例であったが、今回は、control 10例、製品等量OT含有膜埋め込み群8例、高濃度OT含有膜埋め込み群7例、高濃度DBT含有膜埋め込み群6例であった。行動学試験の解析としてはn数がやや少ないという結果ではあったが、改善はあったと考える。一方死亡例は一例もなく、骨にサンドイッチ状になったものもなく、当初の目的通り、

実際の手術の埋め込みに近い点もあった。また膜の吸収も実際起っていると考えられる結果だった。高濃度OT含有膜の吸収量は他の膜より大であったが、脳内で膜がどの程度構造が保たれるかが膜によって異なり、回収しやすさが異なる可能性がある。

オープンフィールド試験は、新規環境下での移所運動活性を移動距離で測定し、また一般適応行動変化を探索行動としてrearingの回数、情動性の測定としてのface washing, body washingの回数、排便数、排尿数で捉える。また適応行動としてラットが落ち着いた時点を示す、最初にグルーミングを始める時間とbody washingの回数を指標とする。今回の実験も過去2年間同様、差が見られなかった。

今回のPPI testでは群間に有意性がなかった。一昨年度の結果では高濃度DBT含有膜群が、80dBのprepulseがあった場合に対照群に比べ有意に%PPIの平均値が低かった。昨年度結果では今回と同様、有意性は見られてなかった。DBTが多くなると神経毒性を示すかどうかについてはまだ検討の余地があると考えるが、今回の使用した膜については認知機能、学習機能に影響は大きくないことが示唆された。

今回の行動学試験では影響が見られなかったが、他の指標、例えば神経伝達物質の変化については検討する価値があると考ええる。

骨によるサンドイッチを避け、かつ手術による損傷を最小限に長期的な埋め込み実験の可能性を探るため、切り出し直径を8mmとしてみたが、表面の損傷はやや改善した。骨の再生の程度から、現行の1ヶ月より長期的な曝露実験も可能であり、実際の膜の吸収を考えると、長期的な曝露を検討するべきであろう。ポジティブコントロールの確立は課題として残されたが、今回の試料を用い比較的長期(2ヵ月)の曝露を行えばどうなるか、興味あるところである。脳の表面の損傷をより少なくするためには、手術の際の感染防止も考慮する必要があり、術後の抗生物質投与も検討する意義がある。

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

開発した深屈曲状態での人工膝関節の安全性を評価するためのシミュレーション法を開発中の新型機種に適応したところ、本機種の最大の特徴であるball-socketが摺動部を形成する際に過度の応力集中が発生することがわかった。したがって、今後、ball-socket構造の安全性をより詳細に検討する必要がある。また、現行の2機種についてシミュレーション法を適用したところ、2機種間のデザインの差が応力分布状態に及ぼす影響を明瞭に示すことができ、さらに、後継機種の安全性を定量的に示すことが可能となった。

以上の結果より、動作状態での応力解析を可能とするシミュレーション法の有用性が示された。次年度は、応力解析をさらに発展させ、人工膝関節脛骨インサートの最重要課題のひとつである摩耗予測解析法の開発を試みる予定である。

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

瘤内へ流入する血流は流入位置にステントストラットがあることによって妨げられ、動脈瘤ネック付近での血流速度に相違が生じた。瘤内への流入する血流位置も、ステントストラットによって変えられている。ネック付近での血流の速度と向きの変化が動脈瘤内の壁ずり応力値に影響を与え、ステントストラットデザインによって動脈瘤内の血行動態に変化をおよぼしたと考えられる。今後は、実験結果との比較が必要である。

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

有限要素解析および疲労シミュレーションによって、ステムの応力分布と疲労寿命推定を行った。応力として、ステム破損の実例として報告されているネック付近および拘束部位付近における最大主応力を評価した。5.3kN荷重を適用した場合におけるモデルAの疲労寿命推定結果は、モデルAをスケーリングして全体体積を小さくすると、疲労寿命が大幅に低下した。モデルBの疲労寿命推定結果は、モデルB-1とモデルA-3ではステム径が同じにも関わらず、ネックの疲労寿命はモデルA-3の方が短く、拘束部位での疲労寿命はモデルB-1の方が短い。モデルA-3はモデルBとステム径は同じであるが、CTが短い。すなわち固定部が短くなり、力学的な安定性が欠けたことが影響したものと考えられる。

一方、モデルB-2はモデルA-1と同じCT長さであるが拘束部位における疲労寿命がモデルA-1よりも低い。モデルB-2はモデルA-1とCTは同じであるが、ステム径は細いため、拘束部位での強度が劣るためと考えられる。これより、ステムの安定性を高めるためにCTを長くするだけでは不十分であることが示唆された。また、モデルA-2とモデルA-3のシミュレーション結果から、標準的体格に用いるステム形状を縮小させてステム径もしくはCTを調節しただけでは、疲労強度は向上できないことが示された。すなわちステムの力学的安定性を高めるためには、患者の体格に合わせたステム径とCT長さのバランスを求めることが重要となる。また、西洋人と東洋人では、大腿骨形状が異なり、東洋人の方が大腿骨の湾曲が大

きいため、特に小柄な女性の場合には標準体格用モデルのデザイン形状は適用できない。ステム径とCT長さをパラメータとしてステムデザインが疲労寿命に及ぼす影響について評価した。実験的手法では、こうしたデザインが及ぼす影響についての評価が困難であり、シミュレーションがこうしたパラメータ評価に対して有効である。

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

皮膚感作の過程で Langerhans cells (LCs) が主な役割を持っていることが知られていることから、ヒト末梢血を用いて研究が進められているがヒト末梢血中での LCs の数が少ない為、実験は困難であった。その為、本研究では、LCs 系の cell line である THP-1 を使用し、LCs 活性のマーカーである Co-stimulatory molecule expression (CD86, CD54) の変化を測定して添加剤の皮膚感作性を *In vitro* で検討した。

まず、皮膚感作性ポジコンとして設定した DNCB と添加剤を溶解する溶媒が細胞の生存率に及ぼす影響を培養時間別に測定した。培地のみ実験群の生存率を 100% とした時、溶媒の実験群である DMSO の生存率の変化はほとんどなかったことから、溶媒による生存率の変化はないと判断された。DNCB の場合、5.2ug/ml の濃度で細胞を処理した時、24 時間までは細胞の生存率に大きい変化がなかったが 48 時間には細胞の生存率がコントロールと比べるとおよそ 60% に低下した。したがって皮膚感作性のポジコンである DNCB は 24 時間に測定するのが一番適切だと判断し、添加剤であるすべてのサンプルも 24 時間培養して生存率と CD86, CD54 の発現量を測定した。

THP-1 細胞に添加剤を処理して 24 時間培養した後、添加剤が細胞の生存率に及ぶ影響を見た。各添加剤は細胞の生存率に異なる影響を及ぼした。添加剤 G4 は濃度依存的に細胞の生存率を減少させ、細胞毒性が一番高いと判断された。G1、G2、G5、7 は最高濃度でも 70% 以上の生存率を示し、細胞生存率に及ぶ影響は弱いと判断された。

感作性の程度を検討した結果、今回使用したすべての添加剤は CD86 の発現への影響はなく、CD54 の発現だけを上昇させた。このことから今回使用した添加剤は CD54 の発現のみに影響を及ぼすと考えられる。一番細胞生存率が低かった G4 では CD54 の発現はほとんど変化なかった。生存率に大きい変化を見せなかった G1、G2、G5、7 の中で特に G1 と G5 は CD54 の発現量が高かった。

今回解析した添加剤では *In vivo* の皮膚減作性実験結果がないので、Local Lymph Node Assay (LLNA) などを行い、今回の結果と比較して詳細に研究する必要があると考えられる。

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

通常、*in vitro* で材料表面上に接触するのみの刺激では炎症系細胞の活性化は弱く、細胞が測定可能な量の炎症関連物質を産生しない可能性がある。そこで、実際の実験系では、細胞を材料上で培養した後、さらに PMA や LPS などの刺激剤を添加して活性酸素や炎症関連サイトカインを測定する。よって、本実験を始める前に、添加する適切な刺激剤の量を決定する必要がある。そこで、種々の濃度の刺激剤を添加した THP-1 からの活性酸素産生量を測定してみたが、今回の条件では全くその産生は確認されなかった。THP-1 からの活性酸素産生に関しては、マクロファージなどと同様に PKC を活性化する PMA により活性酸素を産生することが報告されているため、活性酸素を産生しないとは通常考えられない。しかしながら、THP-1 は継代を重ねることで数々の変異株を生じることも報告されているため、この変異株は外部刺激に対する反応性が変化している可能性は否定できない。事実、今回用いた THP-1 は他の分担研究者から分与されたものであり、IL-6 産生における LPS 感受性が他の THP-1 よりも高いことが明らかになっている。光学顕微鏡観察で、分化した THP-1 が PS を貪食している像も見られたことから、活性酸素産生以外の何らかの指標でその活性化が現れていることは想像に難くない。よって、来年度は、同じ細胞を用いて IL-6 など別の適切な炎症関連メディエータを指標とする、あるいは別の種類の細胞を用いて活性酸素産生量を指標とした検討を行い適切な細胞を選択するなど、本研究の目的に適した実験系の構築を行う。

自己組織化膜を利用した単一官能基表面の構築は、この 10 年強の間に飛躍的に発展してきている。にも関わらず、その均一な表面を利用したリスク評価に関するレギュラトリーサイエンス研究は行われていない。前述したように、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、すなわち生体と材料との界面における現象を捉え、その機構を明らかにすることが非常に重要である。材料表面の特性を決定する要因には様々なものがあるが、その表面の化学構成、すなわち表面官能基もその要因の一つである。様々な官能基に対する生体反応を詳細に検討してその基礎的データを蓄積していくことが、医療機器のリスク評価を行うにあたっては欠かすことができないと考えられる。そこで、本研究では、汎用性の高い医用材料を使用する前に、自己組織化膜を用いたモデル表面を調製し、その上に培養した炎症系細胞の挙動変化を検討することを考えた。本年度は、まず、

6種類の官能基からなる表面の調製が可能であることが、主に ESCA 解析から確認できた。

水酸基表面からリン酸基表面及び硫酸基表面を調製する手法は、既に報告されている。しかしながら、既報告の硫酸基表面調製方法では、表面に非常に多くの副生成物が付着し、洗浄の程度によっては蒸着した金属層が剥がれてくるなどその除去が困難であった。そこで、多糖の水酸基を硫酸化する際に用いる比較的緩和な手法での硫酸基表面調製を試みた。ESCA のデータからはその調製が可能であることが示唆されたが、緩和な化学反応であることから全ての水酸基が硫酸化しているとは考えにくい。また、将来、複数の官能基を様々な比率で持つ表面を調製して、その上での細胞挙動変化観察を計画しているが、そのような表面を調製するためには、今回用いた硫酸化及びリン酸化方法は適用できない。これを解決するために、翌年度は、片末端に硫酸基及びリン酸基を持つ decanethiol の合成を行う。

まず今年度は、これらの表面上に正常ヒト骨芽細胞を播種し、その接着及び増殖挙動の観察を行ったが、官能基に応じてその挙動が影響を受けることが示唆された。この官能基による細胞接着挙動への影響がどのような機構によるのかについても、来年度以降に官能基密度を変化させた表面を調製して検討を行いたい。

なお、疎水性表面であるメチル基表面を調製し細胞実験に使用した場合には、その金属蒸着状況によっては金属層が容易に剥離することが認められた。通常は、金属層とガラス面の間にクロムやチタンの蒸着層を介在させて金属層の剥離を防ぐことが報告されているが、当所に現在ある機器ではこのような対策が困難ではある。来年度は、予めチタン層を蒸着したカバーガラスを入手するなど何らかの対策を行いたい。

13. ラットを用いたフルラーレン(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

今回の試験では、fullerene60 の脳内への直接投与を試み、特に、中樞神経に及ぼす、基本的な行動への毒性および、それに関連する神経伝達物質への影響について観察した。Fullerene の側脳室への直接投与を行った後に、体重の変動を記録したところ、fullerene 投与群の、著しい体重の減少が観察された。今回の試験では、摂食量および摂水量の測定を行っていないため、この体重減少がどのような要因により引き起こされたのかははっきりとした見解はできないが、急激な体重の減少がみられたことから、摂食量、摂水量の減少が要因になったのではないかと考えられる。摂食行動を制御する脳部位として知られている視床下部では、インシュリン、レプチン、ニューロペプチド Y の他、様々な因子により摂食行

動、空腹感や満腹感の発現が制御されており、さらにこれらの因子は活性酸素種の影響を受けることが明らかとなっている⁽⁷⁾。Fullerene60 は、活性酸素種をトラップし、その作用をなくす働きが報告されていることから、fullerene60 がフリーラジカルをトラップすることで、摂食行動に影響を与え、体重の変動をおよぼした可能性がその要因の一つに考えられるが、今後さらに検討する必要がある。また、fullerene 投与群の体重の増加率は、対照群と比べ遅いものの、術後12日で術前と同程度まで回復し、その後も順調に増加したことから、摂食行動および、エネルギー代謝に関する fullerene60 の慢性的な影響・毒性はないものと考えられた。

Fullerene 60 の投与による、自発行動量を測定した結果、術後1日目で fullerene60 投与群において、対照群と比べ、総移動時間および総移動距離の減少傾向が観察された。また、視床下部のドーパミン、その代謝産物である DOPAC, HVA 濃度およびセロトニン、その代謝産物である 5HIAA を測定した結果、fullerene 投与群においてセロトニン、5HIAA 濃度の減少が観察された。ドーパミンは、黒質で合成され、その大部分が線条体に投射されている。快の神経伝達物質として知られており、ドーパミン作動性神経が働くことにより、行動意欲の向上または行動量の増加が引き起こされる。また、パーキンソン病の原因の一つとされており、同疾患は、ドーパミン神経が選択的に脱落することにより、随意運動障害に陥る。セロトニンは、鬱病のターゲットとしても知られており、情動、ホルモン分泌など、生体の恒常性を保つための様々な役割を担っている。特にストレス刺激に関する応答に重要な働きをし、扁桃体の活性化による不安情動の発現や、視床下部から、副腎皮質刺激ホルモンを分泌し、副腎を活性化させ、抗ストレス物質の分泌を放出する。免疫機能にも関連し、中樞にも多く存在するサイトカインと密接に関連し、それぞれの作用を調節していると考えられている。セロトニンの過剰分泌により引き起こされるセロトニン作動性神経の脱感作により、免疫力の低下が引き起こされることが報告されている。摂食行動にも影響し、食餌摂取にセロトニンの分泌が促されることにより、摂食中枢が刺激されることが示唆されている⁽⁸⁾。今回みられたセロトニンの減少の原因については、今後の検討課題であるが、fullerene60 投与の投与により、サイトカインの分泌を促進したことが一つの原因ではないかと考えられた。また、体重の減少も、セロトニン量の減少に起因していることが予想された。今後、fullerene60 投与による脳内サイトカインの変動について調べる必要がある。サイトカインおよびセロトニンは自発行動量やその他様々な行動にも影響を及ぼすことが示

唆されている。手術1日後の fullerene60 投与による行動量の変動に関しても、サイトカインの変動が影響した可能性が考えられる。しかしながら、自発行動量の変化に関しても、致命的な影響や慢性的な毒性はみとめられなかった。

以上の結果から、fullerene60 の側脳室への投与は、セロトニンなどの神経伝達物質の変動を及ぼすことが示された。しかしながら、致命的な毒性や自発行動への影響はないものと考えられた。今後、脳内サイトカインの変動を視野に入れ、投与する脳部位、fullerene の濃度や側鎖の違いについてもさらに精査する必要がある。

E. 結論

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

スルホン化プレートはヒト正常骨芽細胞の分化進行を促進する機能を持つことが判明したと共に、同機能の発現にはIGF、EGF、TGF- β 、BMP、PDGFなどの成長因子が密接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機構を蛋白質レベルで検討する。

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

ナノマテリアルの安全性評価法を探索する目的で、本年度は、卓上型超音波洗浄機およびメノウ乳鉢による粉碎で調製した分散液について、その細胞毒性と粒子径分布の比較を行なった。分散液中にはまだ μm サイズの粒子が残っている状態であったが、同じ材料でも小さな粒子径の分散液の方が細胞毒性が強い傾向がみられた。このことから、100 nm サイズまでの粒子が存在する分散液調製法を考案し、その分散液を用いて生物試験を実施する必要性がより明確になった。ナノマテリアルの安全性評価には、安定した分散液調製法の考案と、分散液中の粒子の情報を少なくとも一つ提供する必要があると考えられる。

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

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を、フーリエ変換赤外光音響分光法を用いて評価した。ハッ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 もハックス平衡塩溶液浸漬によってアパタイトを形成した。Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、ハッ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、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 SNP ジェノタイピングを行い比較検討していく。

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

大阪大学に協力を依頼し、抜去インプラントを入手した。今後も継続的に抜去インプラントを入手し、分析を行う予定である。

抜去インプラントで不具合の要因となりやすいと考えられる UHMWPE 製コンポーネントについて、疲労特性評価方法の確立を目指した検討を行った。抜去インプラントから作製可能な大きさの試験片を用いた ECT 試験では、破断までのサイクル数が公称応力と高い相関を示すことがわかった。また、寸法による影響は見られなかった。この方法は、初期き裂の作製も容易であり、抜去インプラントの疲労特性を簡単に評価する方法として有用であると考えられた。

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

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、不具合の傾向を掴んだ。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

本年度研究では行動学試験では有意な変化が膜埋め込み群と対照群では見られず、過去の研究と合わせて考えると、この方法での評価では、人工硬膜の

埋め込みに害があるとは言えない。モデル実験として8mmの切り出しサイズは適当と考える。

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 東藤 貢 九州大学応用力学研究所准教授)

人工関節のリスクアセスメントへの応用を目的として、力学的に厳しい深屈曲を対象とし、動作状態での応力の推移を求めることができるシミュレーション法を開発した。新型人工膝関節と現行機種に適應した結果、本シミュレーション法の有効性を示すことができた。

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

血流障害能力の定量化をシミュレーションすることができ、リスクアセスメントに応用できる見通しがついた。

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

有限要素解析を用いた数値シミュレーションによって、ステムデザインと疲労強度との関係性を評価した。異なるサイズのステムモデルについて、ステム径とCTをパラメータとして疲労寿命に及ぼす影響を調べた結果、ステム径もしくはCTのみの調節では疲労強度の改善効果は低く、患者の体格を考慮してステム径とCT長さのバランスを考慮する必要がある。

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

今年度は医療機器およびその材料のアレルギーを評価するin vitroの評価法のひとつとして、国内の化粧品会社によりring studyが行われている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、このような物質の感差性を評価する為により適切なマーカーがないかの検討も必要であると思われる。またLLNAの結果との比較を行うことで、本評価法が医療機器およびその材料のアレルギーを評価するin vitroの評価法として妥当であるかの検討も必要であろう。

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

今年度用いた THP-1 では、3種類の活性化試薬を

添加しても活性酸素産生は認められなかった。活性酸素以外の炎症メディエータを指標に採用するか、他のヒト単球由来の細胞、あるいは新鮮血を用いた実験系の構築が必要であることが明らかとなった。

市販の試薬と合成反応により、6種類の官能基からなる単一官能基表面の調製が可能であることが示された。今後は、この手法をさらに改良して、この研究に適した官能基表面調製方法を検討する。

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影響に関する研究

fullerene60の側脳室への投与は、セロトニンなどの神経伝達物質の変動を及ぼすことが示された。しかしながら、致命的な毒性や自発行動への影響はないものと考えられた。今後、脳内サイトカインの変動を視野に入れ、投与する脳部位、fullereneの濃度や側鎖の違いについてもさらに精査する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Takashi Yamada, Rumi Sawada and Toshie Tsuchiya, The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes. Biomaterials accepted 2008
2. Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Ryusuke Nakaoka, and Toshie Tsuchiya, Different effects of [60] fullerene brain injection and i.p. injection on the brain monoamine and behavior in the rats., J. of Nanoscience and Nanotechnology accepted 2008.
3. Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Toshie Tsuchiya: Intracerebral microinjection of stannous 2-ethylhexanoate affects dopamine turnover in cerebral cortex and locomotor activity in rats. Journal of Biomaterial Materials Research: Part B-Applied Biomaterials accepted 2008
4. Kumada H., Haishima Y., Watanabe K., Hasegawa C., Tsuchiya T., Tanamoto K., Umemoto T., Biological properties of the native and synthetic lipid A of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. Oral Microbiology Immunology 2008, 23, 60-69.
5. Matsuoka A., Haishima Y., Hasegawa C., Matsuda Y. and Tsuchiya T.: Organic-solvent

- extraction of model biomaterials for use in the in vitro chromosome aberration test. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.*, Oct. 16 (2007).
6. 土屋利江、粒子特性評価法及び毒性評価法—in vitro、「ナノ粒子・微粒子の毒性評価研究の動向と暴露対策の現状」技術情報協会、2007 pp371-380
 7. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T., FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359, 1, 108-114.
 8. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya. Synthesis of novel beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties. *J. Artificial Organs*, 2007, 10, 22-28.
 9. Shigeyuki Wakitani, Masashi Nawata, Amu Kawaguchi, Takahiro Okabe, Kunio Takaoka, Toshie Tsuchiya, Ryusuke Nakaoka, Hiroyuki Masuda and Kyosuke Miyazaki. Serum keratan sulfate is a promising marker of early articular cartilage breakdown. *Rheumatology*, 2007, 46, 1652-1656.
 10. 中岡竜介、松本富美子、宗林さおり、柳橋哲夫、土屋利江、視力補正を目的としないおしゃれ用カラーコンタクトレンズの細胞毒性、国立医薬品食品衛生研究所報告、2007, 125, 61-64.
 11. Tsunoda, M., Yoshida, T., Tsuji, M, Zhang, Y., Sugaya, Y., Inoue, Y., Miki, T, Satoh, T. and Aizawa, Y. (2008) The effects of dibutyltin (DBT) dichloride on the viability and the productions of tumor necrosis factor and interleukin-12 in murine macrophage cell line, J774.1. *Biomedical Research on Trace Elements* (in press).
 12. Masato Tamai, Kazuo Isama, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: Synthesis of novel beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties, *Journal of Artificial Organs*, 10, 22-28 (2007)
 13. M. Todo, R. Nagamine and S. Yamaguchi, Stress Analysis of PS Type Knee Prostheses under Deep Flexion, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol.2, No.4, 2007, 237-245.
 14. 東藤 貢, 長嶺隆二, 山口勝太, PS 型人工膝関節の動作状態における応力状態の解析, *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, Vo.28, 2007, 233-239.
 15. Inada, K., Ishigooka, J., Anzai, T., Suzuki, E., Miyaoka, H. and Saji, M. (2003) Antisense hippocampal knockdown of NMDA-NR1 by HVJ-liposome vector induces deficit of prepulse inhibition but not of spatial memory. *Neuroscience Research*, 473-481.
 16. Kobayashi, R., Sekino, Y., Shirao, T., Tanaka, S., Ogura, T., Inada, K. and Saji, M. (2004) Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant. *Neuroscience Research*, 49, 205-217.
 17. Tsunoda, M., Yamamoto, K., Ito, K., Inoue, Y., Miki, T., Kudo, Y., Satoh, T. and Aizawa, Y. (2006) Dibutyltin (DBT) dichloride inhibits cytokine productions in murine macrophage cell line, J.774.1. *Biomedical Research on Trace Elements*, 17, 417-422.

学会発表

1. 土屋利江 「医療機器の安全性に関する非臨床試験とGLPについて」 GLP研修会 (2007.9)
2. 土屋利江 「医療機器の開発ツールと審査への対応について」 日本バイオメタリアル学会 (2007.10)
3. 鄭徳泳、山田貴史、土屋利江 「骨芽細胞の播種方法が及ぼす多孔性バイオスキャホールドの力学的特性の変化」 日本バイオメタリアル学会 (2007.6)
4. 松岡厚子、松田良枝、中岡竜介、配島由二、伊佐間和郎、久保敬、中平敦、湯田坂雅子、飯島澄男、土屋利江：ナノ材料の粒度分布と細胞毒性 第29回バイオメタリアル学会 (平成19年11月27)
5. A. Matsuoka, Y. Matsuda, A. Nakahira, T. Kubo, M. Yudasaka, S. Iijima, T. Tsuchiya: Search for an in vitro screening method for biological safety evaluation of nanomaterials 1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (November 29, 2007)