

『表 2』 心臓血管系機器での一般名別健康障害率(抜粋)

Device	健康障害率
Heart-Valve, Mechanical	95.1%
Tissue, Heart-Valve	88.0%
Stent, Coronary, Drug-Eluting	77.7%
Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable	65.6%
Electrode, Pacemaker, Permanent	65.5%
Stent, Coronary	61.9%
Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter	58.1%
System, Balloon, Intra-Aortic And Control	57.1%
Wire, Guide, Catheter	56.4%
Catheter, Intravascular, Diagnostic	41.0%
Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter, With Cardiac Resynchronization	31.4%
Catheter, Angioplasty, Peripheral, Transluminal	29.8%

『表 3』 心臓血管系機器での不具合内容別健康障害率(抜粋)

Problem	健康障害率
Occlusion	99.3%
Lead(s), fracture of	88.4%
Shock, inappropriate	77.5%
Capture, failure to	65.9%
Oversensing	63.4%
Impedance, high	56.1%
Balloon rupture	45.0%
Device breakage	43.9%
Pace, failure to	42.8%
Battery, low	24.5%

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

角田 正史

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

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

分担研究者 角田 正史 北里大学准教授

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、OTを高濃度(200ppm)含んだポリ乳酸等共重合体ポリマーを、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で大きな生体影響は見られなかった。

A. 研究目的

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膜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-エチルヘキサノ酸スズ)(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等共重合体、高濃度OT含有ポリ

乳酸等共重合体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、モデル実験に適当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等共重合体膜埋め込み群、高濃度 DBT(100ppm)含有ポリ乳酸等共重合体膜埋め込み群、高濃度 OT(200ppm) 含有ポリ乳酸等共重合体膜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当なモデルを確立することを試みた。

B. 研究方法

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 含有ポリ乳酸等共重合体膜埋め込み群、高濃度 OT 含有ポリ乳酸等共重合体膜埋め込み群、高濃度 DBT 含有ポリ乳酸等共重合体膜埋め込み群の 4 群に分けた (n=10/群)。ラットはポリ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、委員会で許可を受けた。

2) ポリ乳酸等共重合体膜

製品と同じ濃度の OT 含有ポリ乳酸等共重合体は、三重膜の構造をもった厚さ 300 μ m 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 含有ポリ乳酸等共重合体膜は厚さは 300 μ m とし、残存スズの濃度を 200ppm としてテラレーメードで作成した。高濃度 DBT 含有ポリ乳酸等共重合体膜は、同様に構造は三重膜で、厚さは 300 μ m とし、残存スズの濃度を 100ppm としてテラレーメードで作成した。

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 含有ポリ乳酸等共重合体の重量の平均値 \pm 標準誤差は 12.8 ± 0.5 mg、高濃度 OT 含有ポリ乳酸等共重合体の重量の平均値 \pm 標準誤差 14.3 ± 0.3 mg、高濃度 DBT 含有ポリ乳酸等共重合体の重量の平均値 \pm 標準誤差 14.1 ± 0.6 mg 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 \pm 標準誤差は、control 371.7 ± 5.3 g、製品等量 OT 含有ポリ乳酸等共重合体膜埋め込み群 364.9 ± 6.3 g、高濃度 OT 含有ポリ乳酸等共重合体埋め込み群 375.8 ± 5.0 g、高濃度 DBT 含有ポリ乳酸等共重合体埋め込み群 369.2 ± 4.5 g であった。

ラットに腹腔内投与ネブタール麻酔 (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のポーントレフィンバー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含有ポリ乳酸等共重合体膜か、高濃度OT含有ポリ乳酸等共重合体膜、または高濃度DBT含有ポリ乳酸等共重合体膜を頭蓋内に入れ、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。

C. 研究結果

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±2.6 g、製品等量OT含有膜埋め込み群 77.1±4.3 g、高濃度OT含有膜埋め込み群 68.9±3.6 g、高濃度DBT含有膜埋め込み群63.0±0.7 g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±12.6 g、製品等量OT含有膜埋め込み

群471.9±10.5 g、高濃度OT含有膜埋め込み群 485.0±8.1 g、高濃度DBT含有膜埋め込み群467.4±10.9 g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±0.6mg、高濃度DBT含有膜が9.9±0.8mg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±0.7mg、高濃度OT含有膜 8.5±0.6mg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

図1に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)の結果を示した。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。

図2に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を示した。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

図3にPPI testの結果を示した。%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。

D. 考察

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、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、今回も昨年の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き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。

謝辞

手技にご指導頂いた大阪市立大学医学部、脇谷滋之先生、行動学試験をご指導頂いた北里大学医療衛生学部、佐治眞理先生の深謝申し上げます。

参考文献

栗生修司、久保和彦、尾方里香、大村実、大嶋雄治、島崎洋平、堀哲郎(2000) 有機スズ二世世代長期曝露の行動学的影響、Biomedical Research on Trace Elements, 11, 253-258.

高田孝二. 行動毒性試験の概要 一般

行動観察による方法 脊椎動物. 柳田知治編、毒性試験講座 8 薬物依存、行動毒性. 地人書館、東京、pp.198-212, 1990.

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.

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.

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.

E. 結論

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。

G. 研究発表:

1. 論文発表

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 α and interleukin-12 in murine macrophage cell line, J774.1. Biomedical Research on Trace Elements (in press).

2. 学会発表

角田正史、吉田珠恵、辻雅善、張瑩、

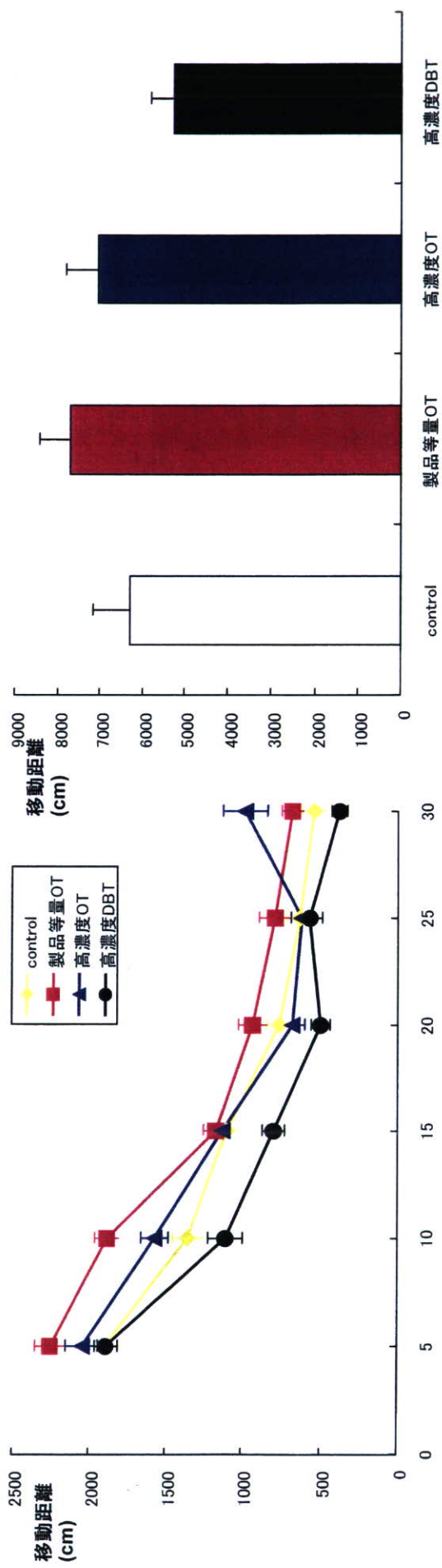
菅谷ちえ美、井上葉子、三木猛生、工藤雄一郎、佐藤敏彦、相澤好治 (2007) 低濃度 DBT 曝露によるマクロファージ系細胞の生存率の低下、サイトカイン産生に対する影響. Biomedical

Research on Trace Elements, 18(2), 186.

H. 知的財産権の出願・登録状況：
特になし。

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

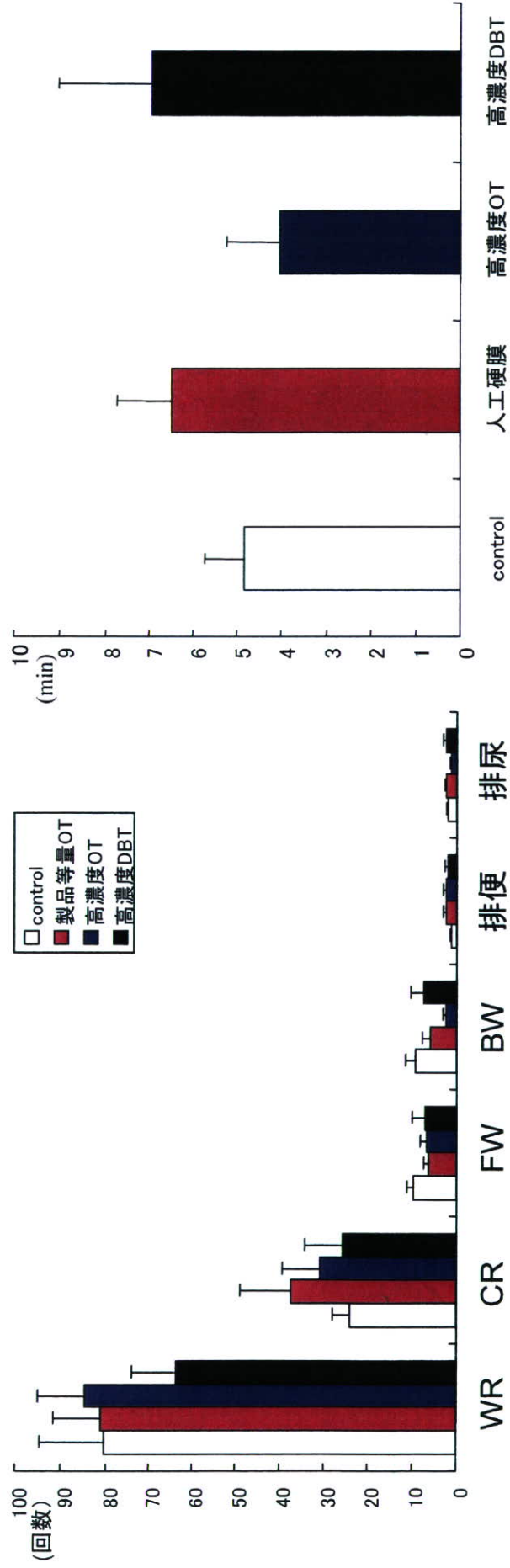
東藤 貢



(A) 時間別移動距離

(B) 総移動距離

図1 製品等量OT含有膜、高濃度OT含有膜または高濃度DBT含有膜を頭蓋内に埋め込んだラットのオープンフィールド試験における移動距離 (注) n=10 (control)、n=8 (製品等量OT)、n=7 (高濃度OT)、n=6 (高濃度DBT)。平均値±標準誤差で示す。(A)時間別(5分毎)に各移動距離を集計、(B)観察期間全体の移動距離



(A) 行動回数

(B) グルーミング開始時間

図2 製品等量OT含有膜、高濃度OT含有膜または高濃度DBT含有膜を頭蓋内に埋め込んだラットのオープンフィールド試験における各種行動の回数及びグルーミング開始時間

注) n=10 (control)、n=8 (製品等量OT)、n=7 (高濃度OT)、n=6 (高濃度DBT)。平均値±標準誤差で示す。WR; wall rearing, CR; center rearing, FW; face washing, BW; body washing

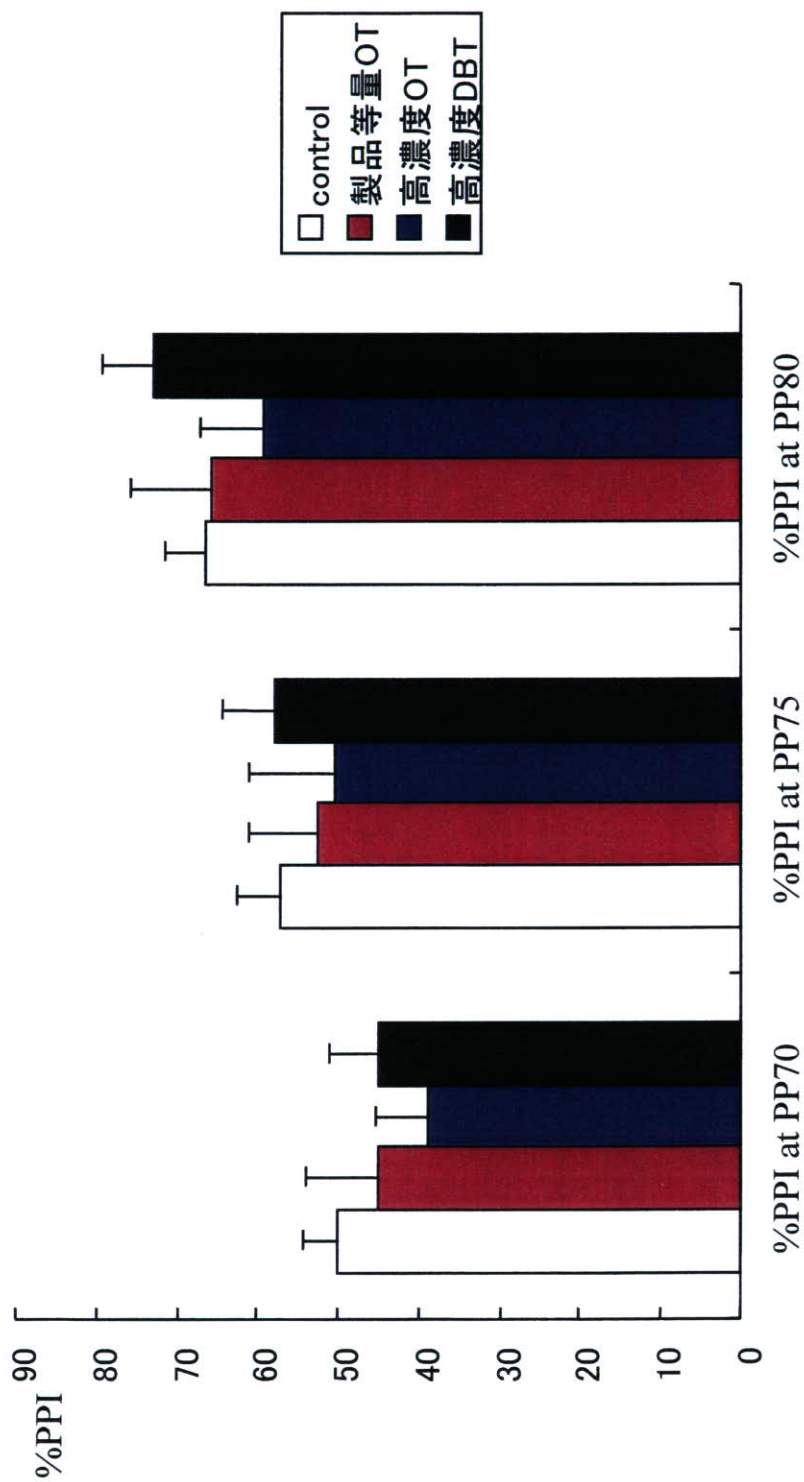


図3 製品等量OT含有膜、高濃度OT含有膜または高濃度DBT含有膜を頭蓋内に埋め込んだラットの聴性驚愕反応のPPIの抑制

注) n=10 (control)、n=8 (製品等量OT)、n=7 (高濃度OT)、n=6 (高濃度DBT)。平均値±標準誤差で示す。PPI: prepulse inhibition