

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

分担研究者 東藤 貢 九州大学応用力学研究所准教授

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定、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。

A. 研究目的

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出来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。

B. 研究方法

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。図1に新型機種の解析モデルを示す。



図1 新型人工膝関節の数値解析モデル

C. 研究結果

図2に屈曲角度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を示す。図1に示した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、図3に断面での相当応力分布状態を示す。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。

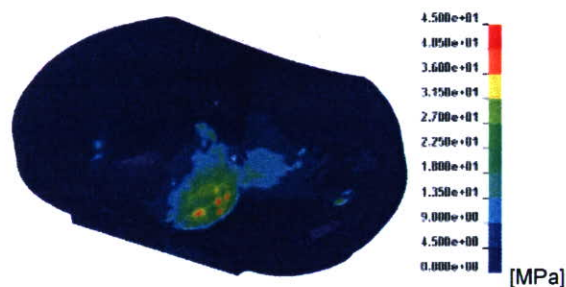


図2 相当応力分布図

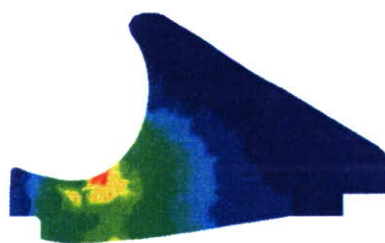


図3 断面での応力分布状態

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図4に示す。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を図5に示す。図5より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

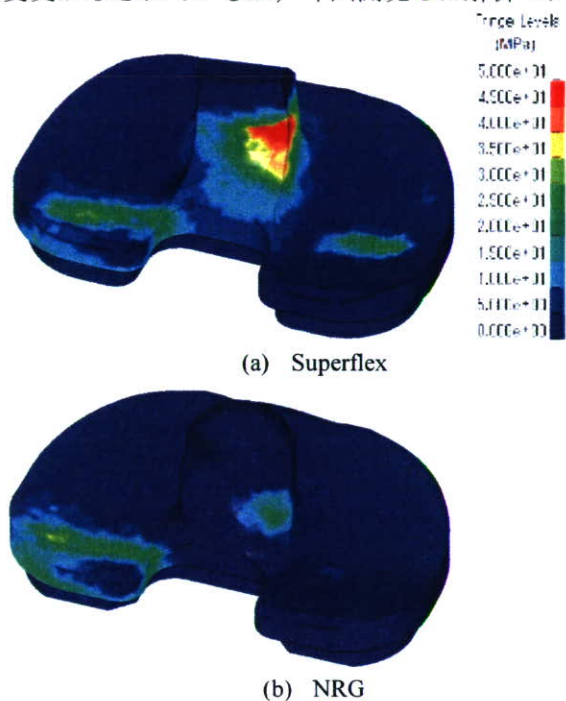


図4 Stryker社2機種種の相当応力分布状態

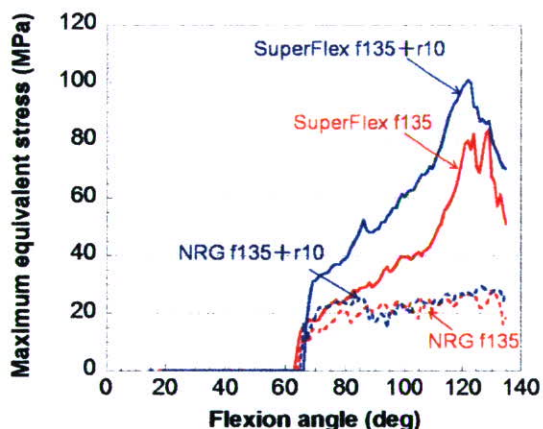


図3 最大相当応力の推移

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。

D. 考察

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用したところ、本機種の特徴である 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。

E. 結論

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用した結果、本シミュレーション法の有効性を示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. 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.
 2. 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.
2. 学会発表
 1. M. Todo, K. Toshiyuki, S. Ide, J. Ito, M. Mawatari and T. Hotokebuchi, Stress analysis of complete flexion knee CFK under dynamic motion, Proceedings of the Third Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2007, S156.
 2. M. Todo and R. Nagamine, Explicit finite element analysis of PS type knee prosthesis under deep knee flexion, Second International Conference on Mechanics of Biomaterials & Tissues, 2007, P06.
 3. 高橋祐二, 東藤貢, 長嶺隆二, 屈曲・回旋を考慮した人工膝関節の応力解析, トライボロジー会議予稿集, 2007, 507-508.
 4. 東藤貢, 歳行健蔵, 井手衆哉, 伊藤純, 馬渡正明, 佛淵孝夫, 完全屈曲型人工膝関節 CFK の深屈曲状態での応力解析, 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会抄録集, 2007, S987.
 5. 東藤貢, 佛淵孝夫, 長嶺隆二, 人工関節のリスクアセスメントにおけるシミュレーション技術の応用, 第 5 回医療機器フォーラム, 2007, 5-14.
 6. 東藤貢, 佛淵孝夫, 長嶺隆二, LS-DYNA による動作状態での人工関節の応力解析, LS-DYNA ユーザー会議講演論文集, 2007, D-2-2-D-2-11
 7. 東藤貢, 長嶺隆二, 高橋祐二, PS 型人工膝関節における繰り返し屈曲動作と脛骨インサートの塑性変形の関係について, 第 34 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2007, 232.
 8. 東藤貢, 歳行健蔵, 伊藤純, 馬渡正明, 佛淵孝夫, 新型人工膝関節 CFK の深屈曲状態での応力集中解析と摩耗予測, 第 20 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2008, 371-372.
 9. 高橋祐二, 東藤貢, 長嶺隆二, 繰り返し屈曲動作が PS 型人工膝関節の応力状態に及ぼす影響, 第 20 回バイオエンジニアリング講演会講演論

文集，2008，373—374.

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

太田 信

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

(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)

分担研究者 太田 信 東北大学流体科学研究所 准教授

研究要旨: 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、バルーンエクパ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。

A. 研究目的

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、Baráth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。

B. 研究方法

医療用の画像装置を用いることで脳動脈瘤用ステントの形状再構築を行うことはほぼ不可能である。これは、医療用画像装置の解像度が0.2[mm]程度であるのに対してステントストラットのサイズが0.1[mm]程度であることが原因である。

そこで、ステント形状と脳動脈瘤の形状の再構築を個々に行い、CAD技術を用いてステント形状を脳動脈瘤形状に設置・マージした。

脳動脈瘤形状の再構築にあたって、まずDigital Subtraction Angiography (DSA) (3D-RA, BV 3000, Philips Medical Systems)により脳動脈瘤の撮影を行い、つぎに出力された医療用画像データをもちいて脳動脈瘤形状の再構築を行った。撮影は以下の手順により行った。DSAのCアームをサイドポジションにセ

ット後、インジェクターによる血管造影剤の注入を行いつつ、Cアームを $22.5 [^\circ / \text{sec}]$ で $180 [^\circ]$ 回転させた。その間 $12.5 [\text{fps}]$ で 8 秒間撮影し、合計 100 枚の回転血管画像を構成した。血管造影剤は Iopamiro 300 (Bracco) を用いて、 3ml/sec で注入した。回転血管画像取得後約 75 秒間で、画像は PC ワークステーションに転送され血管の 3 次元再構築が行われた。

脳動脈瘤用のステントは、バルーンシステムにより拡張されるステンレスステント (INX, Medtronic) を用いた。ステントは、 $60 [\text{kV}]$ 、 $40 [\mu\text{A}]$ でマイクロ CT (SMX-100, 島津製作所) により撮影を行った。Field of View (FOV) は $5.76 \times 5.76 \times 4.77 [\text{mm}]$ であった。

3D 形状の再構築および STL (stereolithography) フォーマットへの変換は、汎用ソフトウェアである Mimics 7.0 (Materialise) および Magics 8.0 (Materialise) を用いた。

ステントは血管壁に沿って脳動脈瘤のネック付近にのみ設置した。Fig. 1 は再構築を行ったステントと脳動脈瘤の形状である。Fig. 2 は脳動脈瘤のネックの部分におけるステント設置位置ある。このようにステントを設置した脳動脈瘤形状に対して数値計算用のメッシュ生成を行った。脳動脈瘤内の血流は、単純化のため等温・非圧縮・層流のニュートン流体と仮定した。密度は $1050 [\text{kg/m}^3]$ 、粘性は $0.0035 [\text{Pa} \cdot \text{s}]$ と設定した。入口端、出口端、血管壁面、瘤壁面、ステント壁面における境界条件は経時不変とした。また、脳動脈におけるレイノルズ数を 200 と仮定し、入口端では $0.162 [\text{m/s}]$ の一様流を設定した。出口端では圧力 $0 [\text{Pa}]$ を仮定し、血管・瘤・ステント壁面は No-slip と仮定した。

ニュートン流を仮定しているため基礎方程式は連続の式とナビエ・ストークス方程式であり、基礎方程式の離散化には有限体積法を用いた。数値解法には数値解析ソルバである Fluent 6.2 (フルーエント社) を使用した。

C. 研究結果

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。

Fig. 3 は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ものである。Fig. 3. (a) はステント留置前、同 (b) ステントを留置した後の等高線図である。

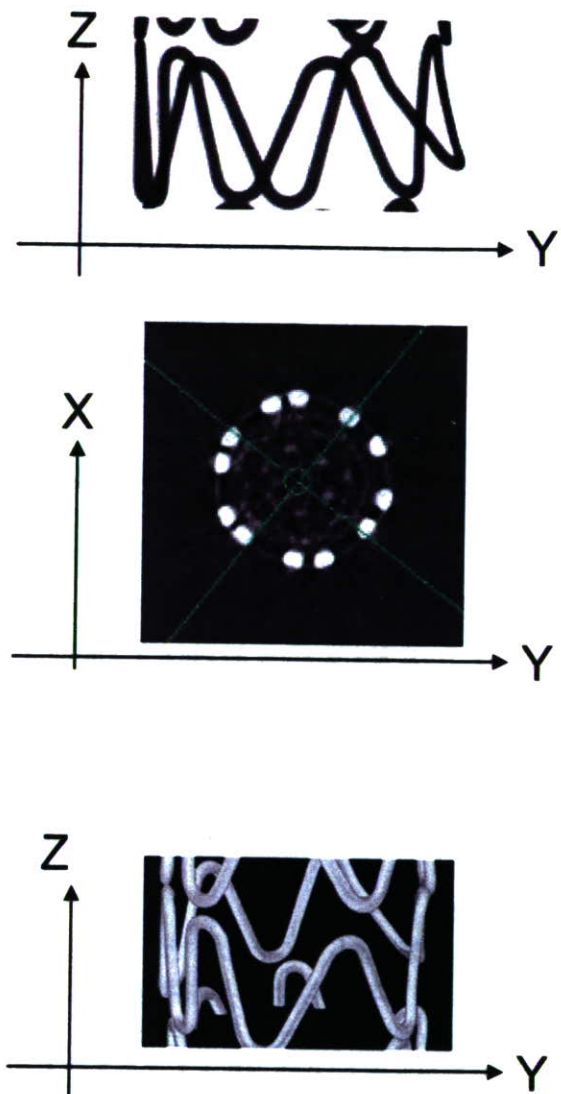
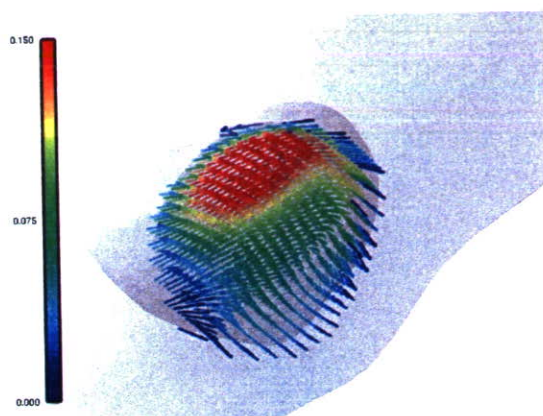


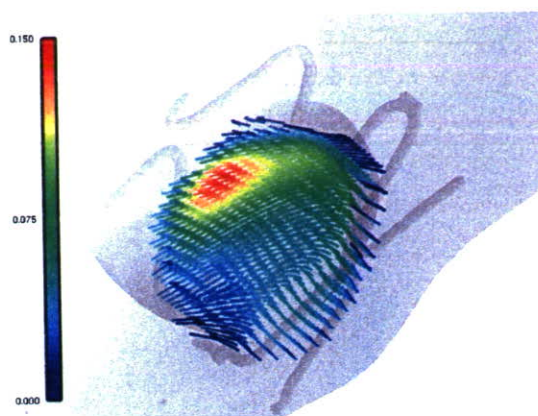
Fig. 1 マイクロ CT によるステントの透視画像と 3 次元再構築



Fig. 2 脳動脈瘤と留置後のステントの様子



ステント留置前



ステント留置後

Fig. 3 ステント留置前と留置後の血流数値流体解析による、ネック付近の流れの可視化

ステント設置前後ではネックにおいて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張り応力値は1.5[Pa]であるが留置後は0.4~0.25[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。

D. 考察

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張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。

E. 結論

血流阻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あった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Makoto Ohta, Naoko Fujimura, Luca Augsburger, Krisztina Barath, Hasan Yilmaz, German Abdo, Karl-Olof Lovblad, Daniel A. Rufenacht, Subtracted Vortex Centers Path Line Method with Cinematic Angiography for Measurement of Flow Speed in Cerebral Aneurysms, Neurological Research, to be published

2. 学会発表

1. Toshio Nakayama, Makoto Ohta, Daniel A. Rufenacht Akira Takahashi “The Effect to Hemodynamics of an Intracranial Aneurysm by a Difference of Stent Struct Design”The 4th International Intracranial Stent Meeting ICS07 PROGRAM&ABSTRACTS 2007 pp. 35-36
2. K. Srinivas, M Ohta, T. Nakayama, S. Obayashi, T. Yamaguchi “Optimisation of Stents for Aneurysm” The 4th International Intracranial Stent Meeting ICS07 PROGRAM&ABSTRACTS 2007 pp. 38,
3. Nakayama, T. Ohta, M. Rufenacht, D. A. Takahashi, A., Effect of Stenting Rotational Positions on Hemodynamics in a Cerebral Aneurysm, American Society of Neuroradiology 2007: Proceedings, 158, 2007 その他4報

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

堤 定美

分担研究者 堤 定美（京都大学再生医科学研究所）

研究要旨

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。

A. 研究目的

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。図1にステムの破損例を示す。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すぐに対応できない。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。



遠位部 ネック部
図1. ステムの破損例

B. 有限要素解析

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、スケーリングした 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。図 2 にモデルを示す。



図2. 人工股関節ステムと有限要素モデル

各モデルのサイズを表 1 に示す。ステム材料はチタン合金 (Ti-15Mo-5Zr-3Al) で、有限要素モデルに適用した材料特性を表 2、疲労特性を図 3 に示す。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。モデルに適用した境界条件を図 4 に示す。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。

表 1. シミュレーションモデルのサイズ

	CT	ステム径
モデル A-1	163mm	19mm
モデル A-2	145mm	17mm
モデル A-3	125mm	14mm

モデル B-1	145mm	14mm
モデル B-2	163mm	15mm
モデル B-3	182mm	19mm

表 2. モデルに適用した材料定数

弾性率	ポアソン比	破断強度	疲労強度
80GPa	0.34	1075MPa	580MPa

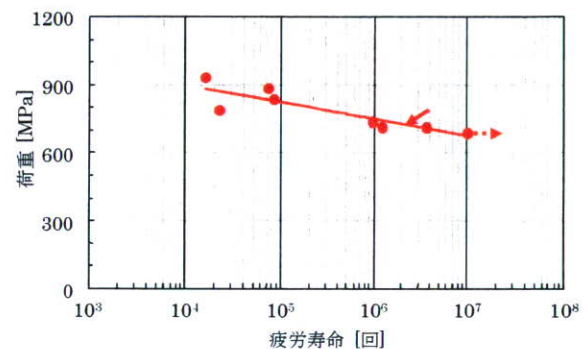


図3. モデル材料に適用した疲労特性

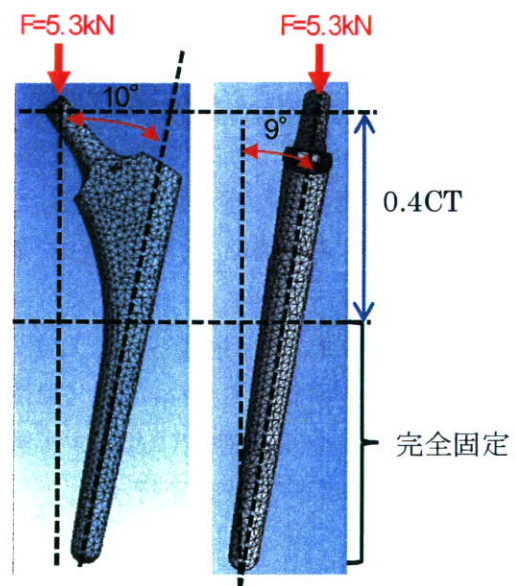


図4. モデルに適用した境界条件

C. 結果と考察

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。図 5 に 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を示す。

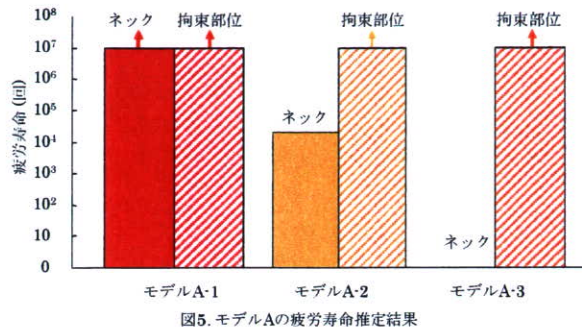
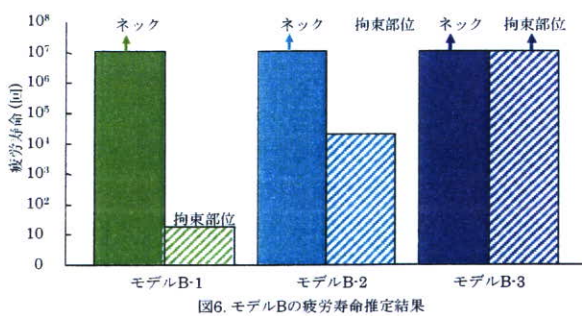


図 5 に示すように、モデル A をスケールして全体体積を小さくすると、疲労寿命が大幅に低下した。図 6 にモデル B の疲労寿命推定結果を示す。モデル B-1 とモデル A-3 ではステム径が同じにも関わらず、ネックの疲労寿命はモデル A-3 の方が短く、拘束部位での疲労寿命はモデル B-1 の方が短い。モデル A-3 はモデル B とステム径は同じであるが、CT が短い。すなわち固定部が短くなり、力学的な安定性が欠けたことが影響したものと考えられる。



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。

D. 結論

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。

E. 研究発表

なし

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

加藤 玲子

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
—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—

分担研究者 加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨

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行う予定である。

A. 研究目的

1993 年米国で ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Method) が創設されて以来、1995 年に EU には ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Method)、日本でも JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Method) が設立された。最近、新原料の安定性評価に動物の使用を禁止する動きや動物実験の代替 (Replacement)、実験規模及び期間の短縮 (Reduction)、実験方法の改良 (Refinement) と言う '3 R s' 運動が世界的に広く進められている。

皮膚に感作を起こすアレルギーは化粧品、医薬品など、様々な化学物質によって誘導される。これまでは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 naïve 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。

B. 研究方法

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、Aldrich) 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 3.2×10^5 (cells/80ul/well) で播種し各濃度希釈系列の working solution の 80ul を添加し、CO₂ 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.

C. 研究結果

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 直が高くなることが分かった。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(図1)。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(図2)。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。

D. 考察

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

(図 1)。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(図 2)。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を図 3 に示した。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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

2. 学会発表

鄭 連淑、加藤玲子、土屋利江 「生体機能材料とその添加物による生体外の皮膚感作テストの開発に関する研究」第7回日本再生医療学会 (2008. 3)

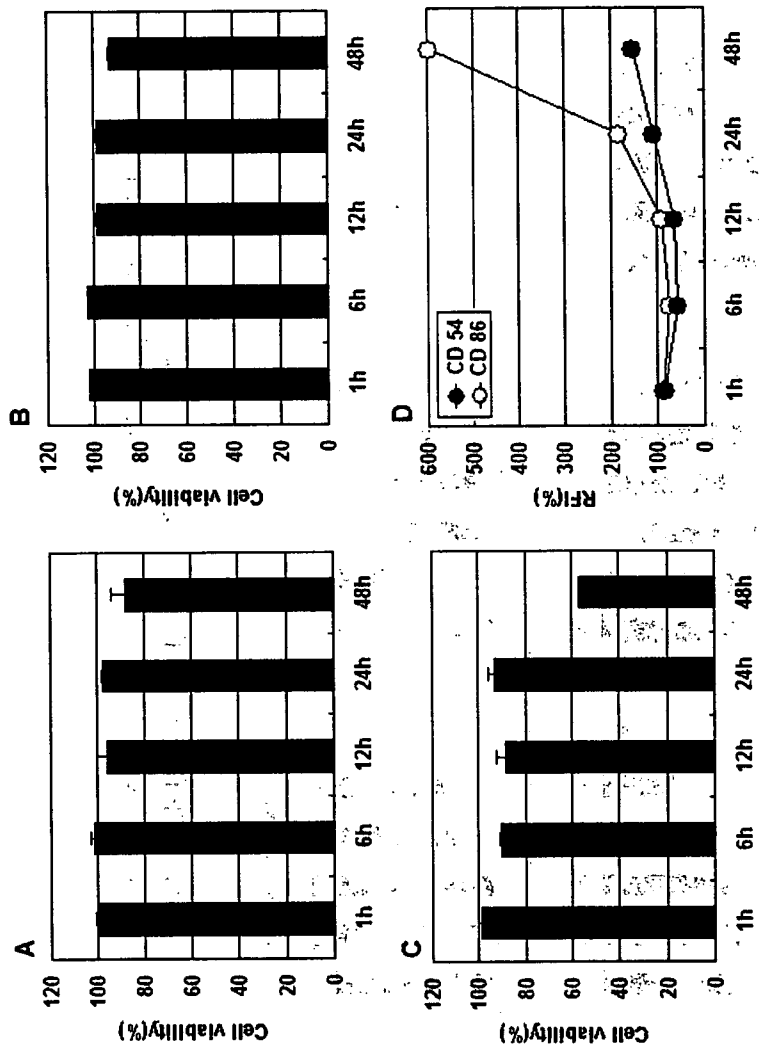


図1: 時間による細胞生存率を培地や溶媒やPositive controlのDNCBと比較した。
 A ; RPMI-1640, B; DMSO (2uL/ml), C; DNCB (5.2ug/ml), D; 時間によるDNCB (5.2ug/ml) の発現

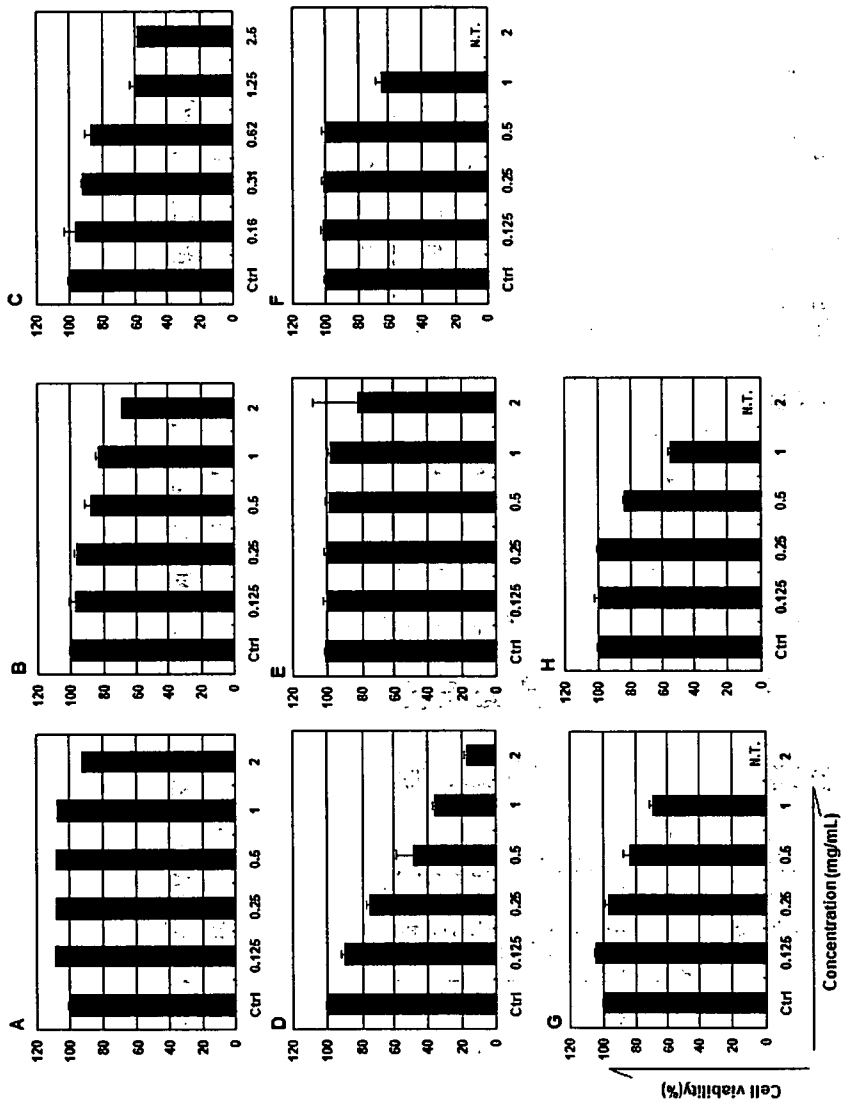


図 2 細胞の生存率を添加剤の濃度によって調べた。
 A; G1, B; G2, C; G3, D; G4, E; G5, F;6, G;7, H;8. N.T.; not tested

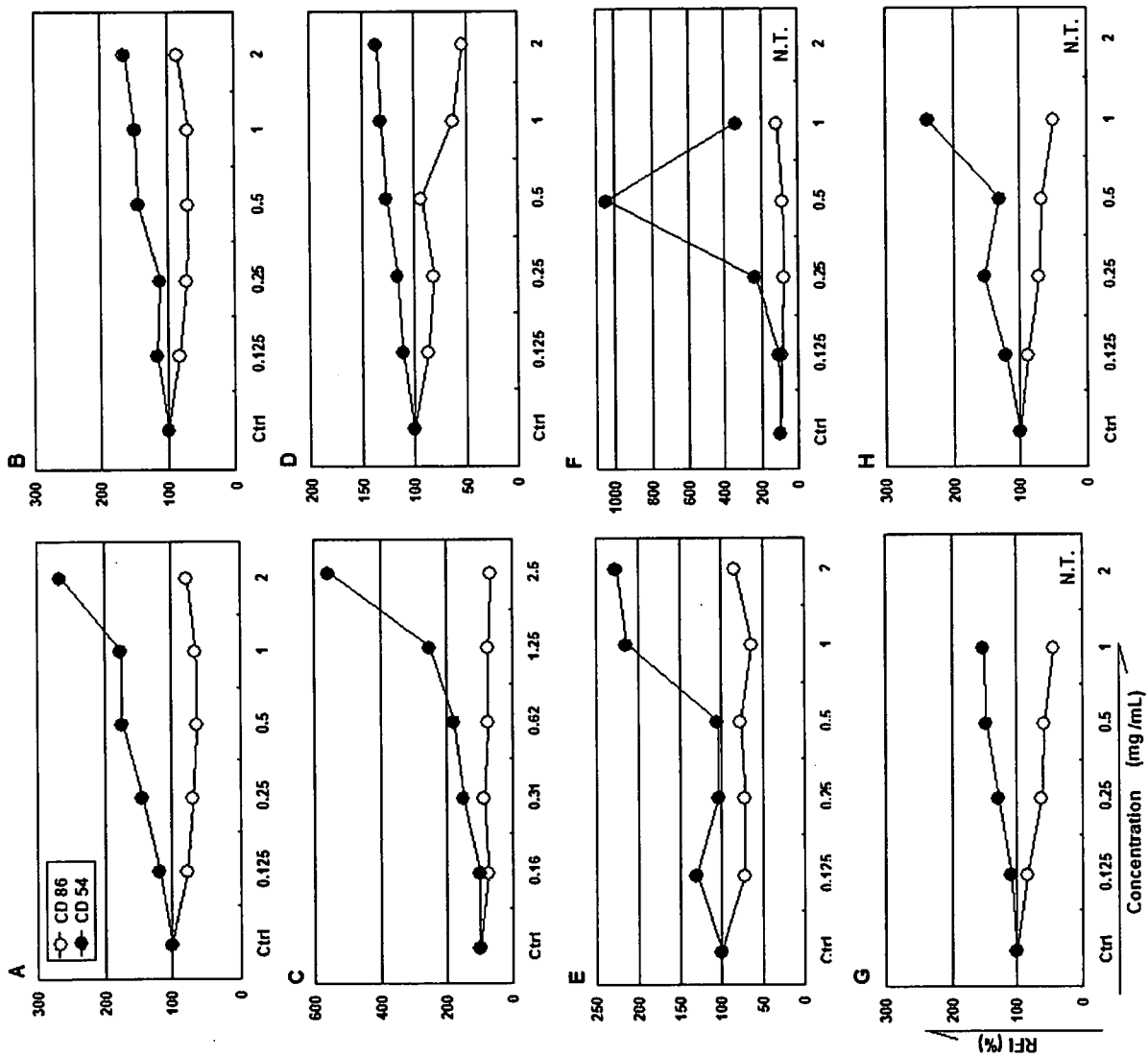


図 3 THP-1細胞に添加剤を入れてRFIの変化を調べた。
 A; G1, B; G2, C; G3, D; G4, E; G5, F; G6, G; G7, H; G8. N.T.; not tested

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

中岡 竜介