

200838031A

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成21(2009)年 4月

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成21(2009)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 .....	総-1
土屋 利江	

### 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 .....	分-1
齧島 由二	
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 .....	分-11
松岡 厚子	
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 .....	分-27
伊佐間和郎	
4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発 .....	分-39
澤田 留美	
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 .....	分-49
迫田 秀行	
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 .....	分-63
佐藤 道夫	
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 .....	分-103
角田 正史	
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-111
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-115

太田 信

10. コンピューターシミュレーションによるステントのリスクアセスメント手法開発  
ステントの力学適合性のコンピューターシミュレーション技術によるリスクアセスメント  
手法開発 …………… 分-123

石川 格

11. ガイドワイヤーの臨床利用状況を考慮したリスクアセスメント手法開発 …………… 分-133

植松 美幸

12. 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-139

加藤 玲子

13. 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-145

中岡 竜介

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 總括研究報告

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、医用材料の機能や生体適合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している。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プレート（スルホン化プレート）がヒト正常骨芽細胞（NH0st）に対して分化促進機能を示すことを見出した。遺伝子発現解析から、種々の成長因子がNH0stの分化進行に関与していた。

平成20年度は、NH0stへの影響を蛋白質レベルで解析した。スルホン化プレート吸収血清を用いた培養系では、NH0stの増殖能及び分化能ともに低下した。同プレートに吸着した蛋白質は全血清蛋白質の0.4%程度に相当し、二次元電気泳動解析において血清蛋白質とは明らかに異なる泳動パターンを示した。スルホン化プレートに吸着する蛋白質のショットガン解析を行った結果、成長因子関連蛋白質（IGF2、IBP2、TFBR3）、細胞外マトリックス（COMP、HABP2、FINC、C01A）のほか、NH0stの分化に重要な役割を果たしているTETN、MIME、骨代謝関連蛋白質としてSPP24、VTDBなど興味ある蛋白質が同定された。

以上、スルホン化プレートが示すNH0stの分化促進機能とプロテオミクス解析結果の間には密接な相関性が認められた。今後、これらの蛋白質が及ぼすNH0stへの影響、および、細胞レベルの蛋白質発現解析などを行うことにより、医用材料のリスクアセスメント手法としてプロテオミクス解析が応用できるかどうか総合的に評価する予定である。

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

ナノマテリアル分散液中の粒子（凝集体）径と細胞毒性の関連について詳細に検討するために、11種のサイズのポリスチレン（PS）粒子を用いて、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株CHLで細胞毒性試験および染色体異常試験を実施した。

平均粒子径0.1-9.2・mまでのサイズ標準PS粒子を用いて細胞毒性試験を実施した結果、0.92-4.45・mまでの粒子が特に強い細胞毒性を示した。染色体異常試験の結果、染色体数的異常（倍数体）が観察され、特に強い細胞毒性を示した0.92-4.45・mのPS粒子が高頻度の倍数体を誘発することが判明した。

走査型電子顕微鏡で4.45・m PS粒子で処理したCHL細胞を観察したところ、細胞が粒子を多く貪食していることが明らかになった。平均粒子径4.45・mとその次に粒子径が大きい5.26・mの粒子との間では、僅かな粒子径の違いであるにも関わらず細胞毒性も倍数体誘発頻度も大きく変化した。フローサイトメトリーでPS粒子取り込み細胞を半定量的に測定したところ、4.45・m PS粒子の方が5.26・m粒子に比べて積極的に細胞内に取りこまれていた。

CHL細胞は特定の粒子径のPS粒子を積極的に貪食し、その結果細胞質分裂が阻害され倍数体を誘発し、最終的には細胞死にいたることが示唆された。ナノマテリアルについても同様に粒子径選択的毒性が観察される可能性もあり、試験分散液中の凝集体の大きさの測定は毒性結果を正確に評価するために必要な情報であると考えられた。

### 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

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でき、リスクの少ない骨系医療機器への応用が期待できる。我々は、表面処理したチタン合金をハンクス平衡塩溶液に浸漬し、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を評価した。FT-IR/PAS 法は、材料表面に形成したアパタイト量を定量的に解析することが可能であった。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、NaOH 処理、NaOH + CaCl<sub>2</sub> 処理、NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の順にアパタイト形成能が高くなった。また、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においてのみアパタイトを形成した。我々が考案した NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理は、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与する方法として有望である。アパタイト形成能の定量的評価は、骨系医用材料のリスクアセスメントに有用であり、アパタイト形成能が高く、骨結合性を有する材料の開発が期待できる。

### 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日本人におけるそれら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 (機械弁) 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が、in vitro 試験による再現や、臨床試験での検証は難しいため、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。しかし、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。

一般的に医療機器の技術進歩は早く、毎年のように新しい技術が導入される。一方で、埋植医療機器は使用期間が長く、抜去インプラントの不具合要因は、既に克服された要因によるものであることも少なくない。例えば、人工股関節では、摺動面に使用される超高分子量ポリエチレンコンポーネントの摩耗が不具合の要因になることが多く報告されている。しかし、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、今後はこれに替わる問題が顕在化する可能性が考えられる。そこで、抜去インプラントを診療情報とともに入手し、個別に不具合の要因について調査することで、今後対策が必要なものの抽出を試みた。

現在までに 5 例の不具合要因解析を行い、その結果、摺動面における問題よりも、インプラントと生体間の界面に関連する問題の方が多かった。不具合の要因は技術の進歩に伴い変化することから、継続的な調査が必要である。

### 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

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、不具合リスクが高い医療機器とその不具合内容をリストアップして臨床使用に際しての注意喚起に役立てることを最終目的とする。米国の膨大な医療機器不具合報告の公開データを手入れし、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。特に、製品に問題があるとされた報告、Adverse Eventを生じた事例に焦点を置き、報告数が多かった心臓血管系・整形外科系を中心に、頻出する機器分類・不具合内容をリストアップすると共に、注目すべき個別分類機器の不具合内容数について解析を行った。これらから、埋め込み型除細動器・ペースメーカー関連の電氣的な不具合、薬物溶出型冠動脈ステントでの閉塞、人工膝・股関節での摩耗・ゆるみ、人工股関節での脱臼、近年の埋め込み型注入器・止血機器・埋め込み型脊髄刺激装置の報告増加、などに最も注意を払うべきと思われる。

### 7. 吸収性材料 (人工硬膜) による長期生体影響のリスクアセスメント手法開発

人工硬膜モデル品と同じ濃度のオクチル酸スズ (OT) を含有したポリ (乳酸、グリコール酸、カプロラクトン等) 共重合体 (PLGC) 膜、ジブチルスズ (DBT) を高濃度 (スズ濃度 100ppm) 含んだ PLGC 膜、OT を高濃度 (200ppm) 含んだ PLGC 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、術後の抗生物質の投与を行った上、2 ヶ月観察し、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、PLGC 膜の吸収が起こる 2 ヶ月の観察が可能になった。本研究のプロトコールに関する限り、PLGC 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

本年度の研究では、医療用画像データを基にした人体膝関節のシミュレーションモデルの構築方法を開発し、人工膝関節の脛骨インサートの応力解析への応用を検討した。このモデルを用いて、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しゃがみ込み等の深屈曲動作を再現し、現行機種別のリスクアセスメントに応用した。その結果、動作過程での応力変動の可視化を通して、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示すことが示された。

## 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阻害能力を、数値流体力学的に定量化し、リスクアセスメント手法として確立することに、現在世界的にも注目を浴びている。この阻害能力は、現在のステントの高機能化に伴うもので、近い将来、必須条件の一つになるとされており、我が国でも種々の要素技術を開発しておく必要がある。とくに本研究では、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っている。特に本年度は、数値流体力学解析の定量化を、医療画像との整合性を行うこと、ステントストラットが流体に及ぼす影響についての検討を行った。

## 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

### ステントの力学適合性のコンピュータシミュレーション技術によるリスクアセスメント手法開発

人工関節や血管内ステントの力学的な設計に関して有限要素法による研究を行うために、製品の形状測定データから形状モデルの作成を行った。光学式三次元形状測定装置を使用して人工股関節および歯科用骨固定材を形状計測し、有限要素解析に使用可能な形状モデルを作成した。作成した歯科用骨固定材の形状モデルを用いて、手術に際して医師の手によって行われる変形操作を考慮した弾塑性解析を行い、単純曲げにおける相当塑性ひずみ分布と残留応力分布を得た。

## 11. ガイドワイヤーの臨床利用状況を考慮したリスクアセスメント手法開発

低侵襲治療の発展に伴い、カテーテルやガイドワイヤーの使用は重要な位置を占めるようになってきている。一方で、医療機器の不具合の軽減は大きな課題である。今回、ガイドワイヤー使用時における重篤な不具合事象のひとつと考えられる血管穿孔が発生する状況を再現し、安全な手技を促すためのリスクアセスメント手法の開発を行う。カテーテルの使用用途は様々であるため、医師にとって基本的な手技のひとつであるセルジンガー法を対象とする。

まず、4名の医師のダイレクタ挿入時に用いる力の計測を行い、今回提案する試験法の適用範囲を設定する。次に、引張試験機を用いた評価系を構築し、プタ頸静脈に対してダイレクタおよびガイドワイヤーを挿入する状況を再現した。ダイレクタを下方に変位させた際に挿入角度を15degから60degまで15deg毎に変更させたときの荷重を計測し、頸静脈、ダイレクタ及びガイドワイヤーの状態を観察した。

医師のダイレクタ挿入力は平均で6.6N、最大で8.8Nであった。引張試験機による試験法では、ガイドワイヤーのみによる血管穿孔は認められなかった。一方で、ダイレクタ挿入角度が45deg、60degのとき血管穿孔が確認された。挿入角度が45deg以下では、一度に10N以上の力が作用しなければ、血管穿孔の可能性は低い。しかし、ダイレクタを繰り返し押し込むことにより血管が伸展、菲薄化し、血管が穿孔する可能性が示唆された。また、挿入角度が60degの場合10N以上の荷重が作用すると、ダイレクタが血管を穿孔させる可能性が高かった。

セルジンガー法施行時における使用状況を再現する評価系を構築し、ダイレクタ挿入角度と荷重の関係を定量化することが可能であった。工学的な視点から、患者に安全に使用する環境を提示でき、構築した評価試験系の有用性と更なる応用の可能性が示された。

## 12. 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

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が、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。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を用いて医用材料として使用される可能性があるポリマーの感作性の評価ができるかの検討をおこなった。その結果、用いたポリマ

一のシリーズは感作性マーカーである 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。そこで今年度は、同ポリマーを用いて Local Lymph Node Assay(LLNA)を行い、昨年度の結果と比較して h-CLAT を用いたアレルギーの評価法が適切な評価法となりうるかの検討を行った結果、両者の結果に相関がある傾向がみられた。しかしながらこの結果を確認するため、今後さらなる検討が必要である。

### 1 3. 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。2 年目は、昨年引き続き、自己組織化膜を用いた種々の組成を持つ官能基表面の調製を行い、このモデル表面上での細胞挙動変化を検討した。また、炎症系モデル細胞の探索も引き続き行った。

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

配島由二 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

松岡厚子 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  
療品部 室長

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 研究員

佐藤道夫 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

角田正史 北里大学医学部衛生学  
准教授

東藤 貢 九州大学応用力学研究所  
准教授

太田 信 東北大学流体科学研究所  
准教授

石川 格 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 研究員

植松 美幸 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 研究員

加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 主任研究官

中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所  
療品部 室長

#### A. 研究目的

##### 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

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。これは、医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面（バイオインターフェース）で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。細胞は材料表面上で構造変化した吸着蛋白質を介して材料に接着することにより、最終的な生体反応を誘導する。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。

医用材料の蛋白質吸着については、血栓形成や細胞接着等に着目した研究が行われてきたが、材料に吸着する蛋白質の種類を網羅的に解析し、その吸着パターンから材料の機能や生体適合性を評価する研究は現在までに実施されていない。材料表面への蛋白質吸着挙動から細胞や組織に対する影響を評価する手法は材料プロテオームと呼ぶべき新しい分野のプロテオミクスとなる。プロテオミクスの技術は培養細胞や埋植材料周辺域における組織の性状変化の解析等にも利用できる。網羅的解析により特定のバイオマーカーを決定することができれば、標的プロテオミクスを利用した同マーカーの微量定量が可能となり、材料の機能や生体適合性、細胞又は組織の状態等を判断するための有益な評価手法となり得る。

そこで本研究では、近年、機能性材料の 1 つとして注目されているスルホン化材料の作用機序を分子レベルで解明することを通じて、プロテオミクス解析が医用材料のリスクアセスメント手法として利用

できるかどうか評価している。平成 19 年度に実施した予備的研究では、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プレート（スルホン化プレート）がヒト正常骨芽細胞（NH0st）に対して分化促進機能を示すことを見出した。また、同プレート上で培養した NH0st の遺伝子発現解析を行った結果、成長因子に対する応答を制御する機能を持つ ZFP36L1 遺伝子の発現量が培養開始後 2 時間目に顕著に上昇することが確認された。その他、IGF 関連遺伝子（IGFBP4、IGFBP7、IGF2、IGF1R、IRS2）、TGF- $\beta$  関連遺伝子（ACVR1C、TGFB2、TGFB3）、BMP 及び TGF- $\beta$  スーパーファミリー遺伝子（GDF5、GDF15）や、NRP1、STAT2 及び WISP1 遺伝子の発現量も早期に上昇するなど、培養初期から培養後期の各段階において、種々の成長因子が NH0st の分化進行に関与していることを明らかにした。

平成 20 年度の本研究では、これらの知見を基礎として、スルホン化プレートが及ぼす NH0st への影響を蛋白質レベルで解析した。

## 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

ナノマテリアルは近年、その開発が活発になり様々な分野での応用が考案されてきている。医療分野ではドラッグデリバリーシステム、遺伝子導入ベクター、細胞培養用スキャフォールド等である。製品への応用がすすみ、我々の身の回りでも使用される機会が増えることが予想され、結果としてそれに暴露されることも多くなる。ナノマテリアルのヒトの健康への影響は未知の部分が多く、その安全性を確認しておくことは、アスベスト被害を経験している日本社会では特に、慎重に対応しなければならない問題だと考えられる。毒性に関しては、いまだ議論があるところではあるが、国際機関（ISO/TC 229）および各国行政当局では、ナノマテリアルの標準化がはすすめられている。国内では、厚生労働省が平成 20 年 2 月 7 日に通知「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」を発出し、平成 20 年 11 月に「ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会」が報告書を取りまとめ、現在（平成 21 年 2 月）も環境省が「ナノ材料環境影響基礎調査検討会」で「工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドライン（仮称）」を、厚生労働省が「ナノマテリアルの安全対策に関する検討会」で報告書を取りまとめているところである。

ナノマテリアルの安全性については、これまでも、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サイズ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。

昨年（初年度）は、入手できた 10 種のナノマテリアルを用いて、主にメノウ乳鉢による粉碎および卓上型超音波洗浄機による分散後、細胞毒性を検討した。その結果、上記の手法では分散が不十分であること、また、そのような分散液でも細胞毒性は検出でき、分散液中の凝集体径と毒性の間に相関が認められることが示唆された。

一般的に不溶性粒子の毒性について、その粒子径との関連はこれまでも報告されてきたが、サイズ数は限られていた。今後ナノマテリアルの評価系では様々な大きさの凝集体の試験をすることが予想されることから、本年度は使用細胞での粒子（凝集体）径と細胞毒性の関係を明らかにするために 11 種のサイズのポリスチレン（PS）粒子を用いて細胞毒性試験および染色体異常試験を実施した。

## 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

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。高齢者人口の増加などによって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。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。その代表例として、アルカリ加熱処理を施したチタン合金が開発され、これを実用化した人工股関節は平成 19 年 10 月に製造販売承認された。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。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。擬似体液を用いる医用材料のアパタイト形成能の評価法は、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、試験材料を擬似体液に浸漬し、走査型電子顕微鏡及び薄膜 X 線回折法を用いて、経時的に材料表面に形

成するアパタイトを観察する。そのため、試験材料の形態に制限があるとともに、アパタイトが形成されるまでに要した時間での評価に留まっている。そこで、試料の形態を選ばず、定量的な解析が可能なフーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) を用いて、チタン合金のアパタイト形成能を評価する方法を検討した。骨系医用材料のアパタイト形成能の定量的評価は、骨結合能に優れた材料の開発に有用であり、骨系医療機器のリスク低減が期待できる。

昨年度は、擬似体液としてハンクス平衡塩溶液を用いて、FT-IR/PAS 法によるアパタイト形成能の評価を試みた。そして、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することを明らかにした。

現在、チタン合金により高いアパタイト形成能を付与する方法として、アルカリ処理後にカルシウムを導入する方法が検討されている。そこで、今年度は、現在検討されている塩化カルシウムによるカルシウム導入法及び我々が考案した水酸化カルシウムによるカルシウム導入法をチタン合金に適用し、これらの表面処理がチタン合金のアパタイト形成能に及ぼす効果を FT-IR/PAS 法を用いて定量的に比較した。

#### 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、心臓の弁が何らかの原因で働きが損なわれる病気の総称で心臓病の大きな原因の一つとして挙げられる。その主な症状として、狭窄症（血液の通り道が狭くなる）と閉鎖不全症（弁の閉じ方が不完全なため血液の逆流が起こる）の 2 つが挙げられる。心臓弁膜症の 95% 以上は、4 つある心臓弁のうち大動脈弁と僧帽弁に起こるといわれている。特に大動脈弁狭窄は心臓弁膜症の中でも病状の進行が早く突然死にいたるリスクも高い難病であったが、人工心臓弁置換手術を行う事により完治することが出来るようになった。現在、臨床的に用いられている人工弁は、大きく分けて機械弁と異種生体弁がある。それぞれの特徴として機械弁は耐久性が高いが抗血栓性に大きな問題があり、生体弁は抗血栓性は高いものの耐久性が低いと一長一短であるが、遠隔成績からは生存率に差はない。機械弁にすべきか生体弁にすべきかについてはそれぞれの症例により違ってくるが、世界でインプラントされている弁は約 60% が機械弁であるといわれている。一方、わが国における人工弁の利用は一説では約 80% が機械弁であるとも言われ米国等に比べて多い。

今日では多くの心臓弁膜症患者が人工弁置換手術により健常人とほぼ同様な日常生活を送れるようになった一方で、置換術後の人工心臓弁（特に機械弁）の機能不全についての報告が存在するのも事実である。機械弁の機能不全の主な原因としては、血栓形成とパンヌス（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、薬の作用の個人差等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、パンヌ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人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（機械弁）を体に埋植した際の血栓やパンヌ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た。特に、血栓形成に対する抗血液凝固療法については、日本人は欧米人と比較すると弱い抗凝固療法でも有効である事がわかっており、わが国のガイドラインは欧米に比べるとやや緩めに設定されているようにその感受性に人種差があると考えられている。抗凝固療法の基本的薬剤であるワーファリンの使用量に関する日本人の遺伝子多型の研究はこれまでも数多くなされているが、心臓弁膜症手術における抗凝固療法に関する遺伝子多型の検討報告はほとんどなされていない。そのため、本研究において日本人の機械弁使用者における機能不全につながる血栓形成の原因となり得る遺伝子多型を検討する事は有意義であろう。また、人工心臓弁機能不全のもう一つの原因と考えられるパンヌス形成に関してはその形成メカニズム自体が不明なため、発生原因につながる遺伝子多型が判明した場合は人工心臓弁の不具合発症予防にも利用できる可能性が期待される。本研究では、人工心臓弁（機械弁）使用者の中で弁の機能不全が認められる患者および不具合が認められない患者の血液を用いて SNP タイピングを行い、両者を比較検討した結果から血栓形成およびパンヌ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

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15万例が行われており、毎年着実に増加している。

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。

人工関節の再置換の原因は、合併症や転倒事故による骨折など患者に起因するものや、設置位置不良など手術手技に起因するものなども考えられる。つまり、不具合の全てがインプラントに起因するわけではない。また、不具合が主にインプラントに起因すると考えられる場合でも、使用年数や患者の体重、活動度など、不具合との関連性に影響を与えられ、重要な要素が少なくない。そのため、抜去インプラントの分析と並行して診療情報の分析も行い、総合的に判断する必要がある。

インプラントに起因するものとしては、摺動面に使用される超高分子量ポリエチレン（Ultra-high molecular weight polyethylene, UHMWPE）コンポーネントの摩耗や疲労といった、耐久性が問題になることが多い。例えば人工股関節では、摩耗粉の発生に起因するゆるみが最大の問題として研究が行われてきた。人工股関節の摺動面で発生するUHMWPE摩耗粉により関節周囲のマクロファージが活性化され、最終的に関節周囲の骨溶解に至ることが知られてきたのである。その結果、人工股関節インプラントを支える周囲の骨がなくなってしまう、ゆるみを生じ、人工関節の機能低下や疼痛により再置換に至るのである。同時に、空気中におけるガンマ線照射滅菌がその後の長年にわたるUHMWPEの酸化劣化を引き起こし、摩耗量の増大につながるということがわかったため、1990年ごろには真空中や不活性ガス中におけるガンマ線照射滅菌か、酸化エチレンガスを用いたガス滅菌に置き換わった。また、耐摩耗性が向上した高密度架橋ポリエチレン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。

このような新しい技術により、人工関節の長寿命化が期待される場所であるが、過去にも実験室レベルでは好成績であったものが臨床では不具合が多く発生した事例があり、最終的な評価は長期臨床成績に依存していることが現実である。

以上のように、人工関節の不具合要因は多様であり、また、技術の進歩により刻々と変化することが考えられる。本研究では、新しい人工関節の開発や審査へフィードバックすることを念頭に、最新の抜去インプラントを臨床情報とともに入手し、これを多角的に分析することで不具合要因の推定を行った。

## 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

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リスクが高い医療機器とその不具合内容をリストアップして臨床使用に際しての注意喚起に役立て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17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、不具合の傾向を明らかにする。

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2008年までの17年間で百万件以上の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に加えて、昨年度の本研究をさらに発展させるために、2008年の情報を追加して、臨床的に影響が大きいと推測される、製品に

問題があるとされた報告、Adverse Event を生じた事例に焦点を置き、報告数が多い心臓血管系、整形外科系の報告を中心に取り上げた。また、参考までに、日本の不具合報告についても集計を行った。

## 7. 吸収性材料（人工硬膜）による長期生体影響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、感染、再手術などのリスクを避けられる。しかし、吸収性人工硬膜の臨床使用では中枢神経系が含有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。

今までの研究で、我々は人工硬膜は、モデルとして、ポリ（乳酸、グリコール酸、カプロラクトン等）共重合体（PLGC）で構成された膜を作製した。重合に触媒としてジブチルスズ（DBT）やオクチル酸スズ（2-エチルヘキサノ酸スズ）（OT）の混合物が使われ人工硬膜に残存する。これらPLGC及び残存物質が頭蓋内で溶け出したときに、どのような影響が起こりうるかは不明である。例えばDBTは強い細胞毒性、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, 2008）。適切な実験モデルを用いPLGC膜の安全性を評価する手法が求められている。

我々の過去の研究では、ラットに脳外科手術を行い、頭蓋内にDBTやOT濃度が異なるPLGC膜を埋め込み、一ヶ月の観察期間終了後、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で評価を行ってきた。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）。埋め込みのための、くり抜く頭蓋骨直径を直径5mmに設定したところ、脳表面の損傷は殆どなかったが、頭蓋骨の再生のスピードが速く、殆どの例で膜が頭蓋骨にサンドイッチ状に挟まれ、骨内に多く埋没していたために、モデルとして問題があった。くり抜きの直径をラットの頭蓋から見て、殆ど限界である1cmに設定した場合は、1月後の観察では膜が骨に埋没しているケースはほとんどなかったが、脳表面の損傷が強く、壊死している個体もあった。そこで頭蓋骨くり抜きの直径を中間の8mmに設定した。この場合も膜が骨に埋没しているケースはなく、脳表面の損傷の程度は1cmの場合に比べれば軽かった。そこで、頭蓋骨くり抜きの直径は8mmが適当と考えるに至った。

一方、PLGCを37℃の生理食塩水に漬けて溶出を検討した実験では1月を過ぎた時点から溶出の速度が上がる。また実際の臨床応用でも、膜が吸収されるまでは長期を要する。安全性評価のモデルとしては、

1月より長い期間が望ましく、8mmの直径で頭蓋骨をくり抜けば、1月より長い観察期間が可能であることが今までの結果より示唆されている。またより現実に近いモデルを確立するためには、脳の損傷、特に感染による損傷はなるべく少なくすることが望ましい。実際の外科手術においては、術後に抗生物質の投与が行われている。現実に近い手段を講じたモデルが望ましいと考えた。

そこで、今回の研究では、頭蓋骨くり抜きの直径を8mmに設定してPLGC膜を埋め込み、術後に術部の消毒を施し抗生物質を投与し感染防止の手段を講じた上で、観察期間を2ヵ月に設定し、行動学試験で評価を行い、吸収性材料の安全性評価のための実験モデルを確立する基礎資料とすることを目的とした。

## 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

現在、高齢化社会を向かえ変形性膝関節症の患者が増加している。この疾病が重度に進行した場合には、現在のところ人工膝関節置換術（total knee arthroplasty; TKA）が最も有効な治療法である。TKAを行うことで患者は痛みから解放され、QOLは格段に改善されるものの、その一方で、繰返し動作による超高分子量ポリエチレン製の脛骨インサートの摩耗や破損及び屈曲角度の制限が重要な問題となっている。この問題を解決するためには、TKA後の膝の動作状態における人工膝関節の力学状態を正確に把握することが重要である。

そこで本研究では、CT画像とMRI画像を基に詳細な3次元生体膝モデルを構築し、人工膝関節を置換したモデルへと発展させ、簡単な屈曲動作で応力解析を行い、モデルの動作状態を確認した。

## 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

脳卒中の主原因の1つである脳動脈瘤の破裂は、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。血管内治療は、低侵襲で患者に対する負担も少ないことから、近年高く注目されている。この治療法に対する機械工学的な主な理論的見解は、デバイスによって脳動脈瘤内への血流を遮断もしくは減少させることである。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。

現在ステントは、ニューロフォームの第一世代をすぎ、シルクステントやパイプラインと言ったストラットの半径が小さなもの、つまり網目が細かいも

のが主流となってきている。これは血流を減少させるためとされているが、血栓形成や塞栓の可能性も高くなっている可能性があることも報告されており、製品としての安全性の確保(リスクアセスメント)は急務となっている。このような問題点は生物学的・生体学的流体力学的な視点からのリスクアセスメントとしての開発が必要である。

瘤内血流については、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。しかしながら、これまでの研究で行われてきた数値流体力学的な研究結果の整合性や、ストラットが流体に及ぼす影響についての検討はこれまでなされておらず、脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメントの開発に欠かせない要素技術である。そこで、本研究では血流と数値流体解析の整合性およびストラットが流体に及ぼす影響についての検討を行った。

血流と数値流体解析の整合性は、特に分岐部での血流分配にて調べた。これまでの研究では、分岐部の血流分配は、その血流が既知の場合流速をアウトレットに定義していたが、その整合性については考慮されたことはなかった。本研究ではアウトレット(出口)の条件定義法について検討を行う。

#### 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 ステントの力学適合性のコンピューターシミュレーション技術によるリスクアセスメント手法開発

人工関節や血管内ステントといった、生体内での力学的支持を目的とするインプラントは、機械的な設計が成績を左右する。人工関節においては、歩行の繰り返し荷重によって疲労破壊しないように、また生体力学的にルーシングやマイグレーションが生じにくくするために人工関節の形状が改良されてきている。また、血管内ステントでは、再狭窄率がステントデザインに依存することが報告されている。このような力学的支持を目的とするインプラントの設計評価を行う際、計算機シミュレーション、特に有限要素法が開発・研究において盛んに利用されている。これは、有限要素法が、実際の使用に近い形で力学状態を再現できる特徴を有しているためである。

有限要素法の解析モデルを作成するにあたっては、まず製品の形状データが必要であるが、その一方で、製品の設計図やCADデータを企業から得ることは一

般的に困難である。さらに、不具合によって除去された人工関節の要因調査を行うような場合には、その人工関節が製造された時期からかなりの時間を経ていることが多く、そのモデルがすでに製造されていないケースもある。そのような場合、製品の設計図を得ることはさらに困難になる。

そこで本研究は、今年度、形状を三次元的に計測できる装置を使用して人工関節や血管内ステントの形状測定を行い、有限要素法に使用可能な形状データの作成を行うことを目的とした。

また、人工関節や血管内ステントに加えて、口腔外科で使用される歯科用骨固定材についても形状モデルの作成と有限要素解析を行うこととした。歯科用骨固定材は、顎骨の固定に使用されるチタン合金プレートである。今回有限要素解析の対象としたのは、特に癌などにより切除した下顎骨を固定するために使用されるケースにおいて、人体内で破断する事故が生じているためである。これは、咀嚼によって繰り返し強い力が加わることによる疲労破壊が原因であると考えられる。歯科用骨固定材は、下顎骨の湾曲に形状を合わせるために、手術時に医師の手により強制的な塑性変形が加えられる。この塑性変形は骨固定材の強度を低下させ、骨固定材が疲労破壊するリスクを増大させる要因となっていることが予想される。そこで、本研究は、弾塑性有限要素解析によって、骨固定プレート変形時の塑性ひずみと残留応力について調べた。

#### 11. ガイドワイヤーの臨床利用状況を考慮したリスクアセスメント手法開発

カテーテルは体腔、管腔または血管などに挿入し、薬液や造影剤の注入点滴や体液の排出に用いられているほか、ステントやバルーンを導入する血管内治療においても欠くことができない存在となっている。その対象や用途は多様であり、治療の低侵襲性から、現在も新たなデバイスを用いた治療法が開発されている。

一方で、カテーテルやガイドワイヤーの不具合について、「医療機器不具合等報告」(厚生労働省・医療機器安全対策部会)で調査結果が報告されている。医療の安全・安心を確保するためには、これらの不具合件数の軽減が望まれるが、そのためには、まず、何が問題となっているのか原因を洗い出すことが先決であると考えられる。カテーテルを用いた手技は日常医療の中で広く行われており、件数も増加の傾向にある。また、医療従事者のスキルや患者の状態などによっても不具合の発生状況は異なる。そして、これらの原因を明らかにし、対処法を立てることが重要である。

そこで、工学的な視点から、デバイスを臨床利用する状況を模擬する評価系を構築し、患者に安全に

使用する環境の提示を試みる。今回は特に、カテーテル手技の中でも全ての医師に要求される基本的手技ともいえる中心静脈カテーテルに着目し、臨床中の状況を模擬する評価系を構築し、セルジンガー法における留意点の調査を行った事例について紹介する。

## 1 2. 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

皮膚アレルギー性は化粧品・医薬品などにも含まれる様々な化学物質によって誘導される。これまで化学物質の皮膚アレルギー性を評価する皮膚感作性評価法 (Skin sensitization test) としては主に Guinea Pig Maximization Test (GPMT) が使用されてきたが、最近、濃度依存的評価や動物数、期間および費用の減少などで優れていることから、Local Lymph Node Assay (LLNA) が皮膚感作性の動物実験として使用されるようになってきている。しかしながら近年、世界的に種々な物質の安全性評価に動物の使用を禁止する運動が広く進められている。こういった背景から、動物実験の代替法の開発が進められてきているが、in vitro での皮膚アレルギー性のメカニズムを一つの評価系として再現するのは非常に難しい。そこで感作誘導過程に関わる種々の反応を個別に再現することが検討されてきている。なかでも皮膚アレルギー性において抗原の情報を T 細胞に提示する抗原提示細胞として重要な役割を果たすのが表皮内のランゲルハンス細胞であることから、ランゲルハンス細胞の活性化に着目した試験法が報告されている。この方法は、感作誘導過程においてランゲルハンス細胞で発現変化が起こると知られている表面マーカーやサイトカインおよびケモカインの発現変化を指標にしたものである。しかしながら、表皮細胞中にランゲルハンス細胞は 1-3% しか存在しておらず、その分離が難しいこと等から評価への応用は困難であると考えられている。そのためランゲルハンス細胞の代わりとしてヒト単球由来細胞株やヒト末梢血由来樹状細胞を用いた評価法が開発されてきている。

human Cell Line Activation Test (h-CLAT) は、ヒトの単球系白血病細胞株である THP-1 を用いた in vitro 評価法である。THP-1 もランゲルハンス細胞と同様に皮膚アレルギー性物質に暴露されると、共刺激分子である CD86 および細胞間接着因子である CD54 の発現が上昇し、主要組織適合性複合体抗原 (MHC class II) のインターナリゼーションが起こることが報告されている。これらの情報を基に h-CLAT は CD86 と CD54 の発現変化を指標に皮膚アレルギー性物質を評価する方法として開発された評価法である。昨年度はこの方法を用いて、医用材料である数種のポリマーのアレルギー性を検討した。その結果、

今回用いたポリマーのシリーズは感作性マーカーである 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。そこで本年度は In vivo の Local Lymph Node Assay (LLNA) を用いて昨年度用いたポリマーの影響を検討し、In vitro の結果と比較して、実際に h-CLAT を用いた評価法が医療機器およびその材料のアレルギー性を評価する in vitro の評価法として妥当であるかの検討をおこなった。

## 1 3. 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

体内埋め込み (埋植) 型医療機器での炎症反応による不具合が何例か報告されているが、その原因の 1 つは機器を構成する材料に起因していると考えられる。特に、生体内の過酷な環境により、機器を構成する材料の分解などに伴う物質や溶出物が炎症を引き起こしている可能性は大きい。一方、埋植型医療機器を埋植した場合には、生体と接触する機器の表面特性、例えば化学構造やその表面荒さ、材質に起因した表面自由エネルギー等に応じて、様々な生体反応が生じることが知られている。理想的には、生体内で生体組織と良くなじみ、半永久的に機能を保ち且つ生体に対して何ら障害を引き起こさないことが望ましい。しかしながら、医療機器として使用するにあたっては、一定期間必要な機能を保ち続けること、埋植可能な大きさに整形することなどの制限があるため、生体に対する影響のみを考慮しての設計及び作製は困難である。よって、医療機器として使用する利益とその材質や形状から来る不利益とのバランスを考慮しなければならない。その不利益を評価するためには、動物を用いた埋植試験が有効であるが、近年、動物愛護運動の高まりから、社会的にそのような埋植試験の減少が求められていること、また、費用などの観点からも、in vivo 試験代替法の開発が急務となっている。

医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、材料及びその溶出物による毒性以外に、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用が大きな要因となる。まず、埋植直後にはその周囲組織に炎症反応が生じる。炎症反応は、材料に毒性が認められない場合でも、材料の生体適合性に応じて誘導される異物反応で生じる。この炎症は埋植後に生じる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・予測できる方法の開発が必要と考えられている。材料の毒性を in vitro で評価した材料毒性と埋植初期の炎症との関連性を検討する研究は既に進んでいるが、材料・細胞相互作用によって生じる炎症系細胞への影響を in vitro で評価し、実際に動物に埋植した後に誘導される炎症反応とを詳細に比較検討する試みは比較的少ない。そこで、汎用性の高い種々の医用材料や、特性を様々

に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して、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を目的として本研究を行っている。このような研究で、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ことが期待される。本研究では、種々の表面特性をもつモデル表面の作製を試みるとともに、*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。また、これらの検討を通じて、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。

## 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調製

Wakabayashi らの報告に従い、住友ベークライト社製 (SUMILON) のポリスチレン製細胞培養用 24 ウェルプレート及びポリスチレン製細胞培養用トレイ (22.5 x 22.5 cm) に濃硫酸 (和光純薬, 超微量分析用) を添加した後、37°C で 4 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 10 分間照射して滅菌した。

#### (2) 吸収血清の調製と蛋白質の回収

スルホン化トレイに 25 ml の牛胎児血清を添加し、4°C で 24 時間緩やかに振とうした後、回収してスルホン化プレート吸収血清を調製した。一連の操作は全て無菌的に行った。未処理の細胞培養用トレイを使用して同様の操作を行い、対照吸収血清を調製した。

上記のスルホン化トレイ及び対照トレイを氷冷した 1 mM PBS により 5 回洗浄した後、20 ml の Sigma 社製 Chaotropic Membrane Extraction Reagent 3 (Reagent 3) を添加し、室温で 20 分間、緩やかに振とうした。同溶液から冷メタノール沈殿法により粗蛋白質画分を回収し、Reagent 3 に溶解後、GE 社製 2DQuant により蛋白質量を測定した。得られた粗蛋白質は GE 社製 Clean Up Kit により精製し、Reagent 3 に再溶解して蛋白質量を測定した後、試験に供するまで凍結保存した。

牛胎児血清 5 ml から冷メタノール沈殿法により粗蛋白質画分を回収した後、上記の方法に従って、血清蛋白質試料を調製した。

#### (3) ヒト正常骨芽細胞の培養

ヒト正常骨芽細胞 (CAMBEX, 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 デキサメタゾンのほか、10% の牛胎児血清、スルホン化トレイ吸収血清及び対照吸収血清をそれぞれ含有する  $\alpha$ -MEM (GIBCO) 培地を使用した。細胞培養用プレートとしては未処理及びスルホン化処理を施した 24 ウェルプレートを使用し、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%  $\text{CO}_2$  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、 $30 \cdot 1/\text{ml}$  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、 $150 \cdot 1$  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 1 回洗浄後、4 mM パラニトロフェニルリン酸、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 mM  $\text{ZnCl}_2$  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 分間インキュベート後、上清  $150 \cdot 1$  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。

#### (5) 二次元電気泳動

蛋白質の蛍光標識 (minimal labelling 法) 及び二次元電気泳動は Ettan DIGE 簡易マニュアル (GE 社製) に記載された標準プロトコールに従って実施した。

血清蛋白質及びスルホン化トレイ吸着蛋白質各 50  $\cdot$  g を常法に従って、還元 (DTT)、アルキル化 (ヨードアセトアミド) した後、血清蛋白質は Cy3、スルホン化トレイ吸着蛋白質は Cy5 により蛍光標識した。また、等量 (各 25  $\cdot$  g) の両蛋白質を混合し、還元・アルキル化した後、Cy2 標識して内部標準試料とした。上記の全ての標識蛋白質を混合して試料とし、電気泳動に供した (n=3)。

一次元目の等電点電気泳動は、GE 社製ドライストリップ (3-11NL, 24 cm) を使用して、同社製 IPGphor II により行った。回収したドライストリップは平衡化した後、二次元目の SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は、バインドシラン処理された DRC 社製低蛍光プレキャストゲル (12.5%, 20 x 26 cm) を使用し、GE 社製 DALT6 システムにより行った。

二次元電気泳動終了後、GE 社製 Typhoon 9400 により蛍光画像を取り込み、DeCyder 2D ソフトウェアを利用してデータ解析及びピッキングリストの作成を行った。

ピッキング用試料として、還元・アルキル化したスルホン化トレイ吸着蛋白質 150  $\cdot$  g を CyDye 標識することなく、同スケールの二次元電気泳動に供し

た。泳動終了後、ゲルを固定及びDeepPurple (GE社製)により蛍光染色し、Typhoon 9400 を使用してイメージを取り込んだ。DeCyder 2D ソフトウェアを利用して先に泳動した CyDye 標識ゲル (Cye 5 画像) とマッチングした後、ピッキングリストに従って、アズワン社製 ProHunter を用いてスポットを分取した。

## (6) ショットガン解析

### 6-1. In-Solution Digestion

還元・アルキル化した血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質 (各 50 · g) を含む Reagent 3 溶液 8 · l に 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (87.2 · l)、プロメガ社製 ProteaseMax Surfactant (1%, 3 · l) 及び Trypsin Gold (1 · g/ml, 1.8 · l) を添加し、37°C で 3 時間インキュベーションした後、10% TFA 5.25 · l を加え、室温で 5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドはバリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 · l) を使用して脱塩し、LC-MS/MS 分析に供した。

### 6-2. In-gel Digestion

還元・アルキル化したスルホン化プレート吸着蛋白質 (100 · g) を GE 社製ドライストリップ (3-11NL, 24 cm) を使用して等電点電気泳動した。ドライストリップを 2 cm 間隔 (酸性側から Zone 1-11) で切断し、各断片を更に細かく裁断した後、エッペンチューブに取り込み、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (400 · l)、アセトニトリル/50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1:1 v/v, 400 · l) 及びアセトニトリル 400 · l で順次洗浄し、サーモフィッシャー社製 Speed Vac を使用して乾燥させた。Trypsin Gold (12 ng/·l) 及び Protease Max Surfactant (0.025%) を含む 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液 30 · l を添加し、氷冷下 30 分間放置した後、30 · l の 0.025% ProteaseMax Surfactant 含有 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を加え、37°C で 3 時間インキュベーションした。反応液を採取した後、残渣のゲル片を 0.01% ProteaseMax Surfactant 含有 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (20 · l) 及び 0.01% ProteaseMax Surfactant 含有 1% TFA で順次 5 分間洗浄し、各洗液を先に回収した反応液に加えた。得られたペプチドは OMIX Tip (C18, 100 · l) を使用して脱塩し、LC-MS/MS 分析に供した。

### 6-3. LC-MS/MS 解析

Nano LC としては、AMR 社製 Magic C18AQ3 · カラム (100A, 0.075 x 150 mm) 及びトラップカートリッジを接続した AMR 社製 Paladim を使用した。溶離液としては、A 液 (0.1% 酢酸含有 2% アセトニトリル) 及び B 液 (0.1% 酢酸含有 90% アセトニトリル) を使用し、流速 300 nl/min、B 液 5-55%/60 min の条件でグラジエント溶出した。質量分析計としては、nano-spray interface を装備したアプライド社製

QTRAP 4000 を使用し、ESI positive mode により、1 Scan 当たり EMS と MS/MS スペクトル (Top 3/scan) を測定した。データベース解析には、In house Mascot Database を利用した。

## 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) サイズ標準ポリスチレン (PS) 粒子

Spherotec Inc. (Lake Forest, IL, USA) より購入した、以下の 11 種のサイズの PS 粒子を用いた。

平均直径 ± SD:	0.10 ± 0.0024 · m
	0.20 ± 0.005 · m
	0.51 ± 0.012 · m
	0.92 ± 0.023 · m
	1.09 ± 0.027 · m
	2.07 ± 0.05 · m
	3.17 · m
	4.45 · m
	5.26 · m
	6.8 · m
	9.2 · m

### (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標準的に使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、飽湿 37°C 条件下で培養した。

### (3) 細胞毒性試験 (コロニー法)

24-well プレートに 50 細胞/well の CHL 細胞を播種し、翌日 PS 粒子を添加し、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) 染色体異常試験

直径 60 mm のプラスチックシャーレに  $1 \times 10^5$ /plate の細胞を播種し、翌日 PS 粒子を添加、24 時間または 48 時間処理後に染色体標本を作製した。ギムザ染色後、広がりの良い分裂中期細胞 100 個を観察し、染色体構造異常と数的異常を記録した。

### (5) フーリエ変換全反射赤外吸収 (FT-IR/ATR) スペクトル測定及びキャピラリー電気泳動分析

PS 粒子の FT-IR/ATR スペクトルは、SPX-200 (日本電子株式会社) に DuraScope (Smiths Detection) を装着して測定した。全反射結晶/フォーカシングレ

ンズには、1 回反射型のダイヤモンド／セレン化亜鉛を用いた。

分散媒のキャピラリー電気泳動分析は、CAPI-3300 システム（大塚電子株式会社）を用いた。泳動条件は、キャピラリー：フューズドシリカ（内径 75  $\mu\text{m}$  × 有効長 48 cm、大塚電子株式会社）、緩衝液：10 mM イミダゾール、5 mM 2-ヒドロキシイソ酪酸、2 mM 18-クラウン-6-エーテル及び0.2% 酢酸、電圧：10.0 kV、温度：25.0 $^{\circ}\text{C}$ 、検出波長：210 nm 並びにサンプル注入：落差法（25 mm、30 sec）とした。

#### (6) 走査型電子顕微鏡（SEM）観察

直径 35 mm のプラスチックシャーレに  $1 \times 10^4$  の細胞を播種し、翌日 PS 粒子を添加し、24 時間処理後、観察用試料とした。具体的には、処理液を除き、PBS でリンス後、2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde 液で前固定後、1% osmium oxide で後固定を行った。その後液体窒素で凍結した試料を凍結乾燥させ、金で蒸着後 SEM（日本電子 JSM-5800LV）観察を行った。

#### (7) フローサイトメトリー

PS 粒子の細胞内取り込みを半定量的に測定するために、PS 処理後の細胞の側方散乱光を測定した。側方散乱光はレーザービームの光軸に対して 90 $^{\circ}$  の角度で検出される光で、細胞の顆粒性状、内部構造にほぼ比例すると考えられている。

### 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

#### (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、それらの合金を構成している元素の純金属として、Ti、Zr 及び Nb を用いた。さらに、従来から汎用されているチタン合金として、Ti-6Al-4V を用いた。

いずれの試料も直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円盤状に加工した後、#400、#800 及び #1200 のシリコンカーバイト製耐水研磨紙を用いて、純水中で表面を研磨仕上げした。その後、酢酸エチル、アセトン、エタノール及び超純水の順に超音波洗浄した。

#### (2) 表面処理

試料をポリプロピレン製容器に入れ、5 mol/l 水酸化ナトリウム溶液（和光純薬工業株式会社）17.5 ml を加えて、温度 60.0 $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間静置した（NaOH 処理）。

NaOH 処理した試料をポリプロピレン製容器に入れ、0.1 mol/l 塩化カルシウム溶液 17.5 ml を加えて、温度 60.0 $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間静置した（NaOH + CaCl<sub>2</sub> 処理）。

それとは別に、NaOH 処理した試料をポリプロピレン製容器に入れ、0.01 mol/l 水酸化カルシウム溶液 17.5 ml を加えて、温度 60.0 $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間静置した（NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理）。

#### (3) 擬似体液浸漬

試料をポリプロピレン製容器に入れ、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、インビトロジェン株式会社）35 ml を加えた。容器を温度 37.0 $^{\circ}\text{C}$  に設定したインキュベータ内に 1 週間静置した。ハックス平衡塩溶液は一日おきに新鮮なものと交換した。

#### (4) 蛍光 X 線分析（XRF）

三次元偏光光学系を持つエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 PANalytical Epsilon 5（スペクトリス株式会社）を使用した。試料を厚さ 4  $\mu\text{m}$  のプロレンフィルム（Chemplex Industries, Inc.）に挟んでサンプルカップに固定し、真空雰囲気中で表 2 に示した条件で測定した。ファンダメンタルパラメーター法を用いて定性定量した。

#### (5) デジタル顕微鏡観察

デジタルマイクロスコプ VH-8000C（株式会社キーエンス）を使用し、ズームレンズ VH-Z25（25-175 倍、キーエンス）又は高倍率ズームレンズ VH-Z450（450-3000 倍、キーエンス）を装着して観察した。

#### (6) 走査型電子顕微鏡観察（SEM）

走査型電子顕微鏡 JSM-5800LV（日本電子株式会社）を使用した。試料を常法に従って金蒸着した後、加速電圧 15 kV で観察した。

#### (7) フーリエ変換赤外光音響分光分析（FT-IR/PAS）

フーリエ変換赤外分光光度計 JIR-SPX200（日本電子株式会社）を使用し、光音響検出器 MTEC Model 300（MTEC Photoacoustics Inc.）を装着した。スキャンスピード 2.0 mm/sec、分解能 8 cm<sup>-1</sup>、補間 7 ポイント、アポダイゼーション Happ-Genzel、プリアンプゲイン 10,000 $\times$ 、スキャン回数 1024 回とした。試料を試料セルに導入し、試料セル内の水蒸気を除去するために乾燥空気ですばやくパージしてから測定した。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

久留米大学医学部外科学講座また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人工心臓弁置換手術を過去に施された患者から採血し、血液より DNA を抽出する。検体として採取した血液は、久留米大学医学部外科学講座また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行う SNP タイピングのターゲット遺伝子として、まず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である SERPINE1 [serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1; PAI-1]、CYP2C9 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9)、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、GGCX (γ-グルタミルカルボキシラーゼ) の 7 遺伝子について着目し、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 23SNPs を選定した。さらに炎症反応等に関わる遺伝子として VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8)、TGF-β (transforming growth factor-β) 1、TGF-β レセプター I (TGF-β RI)、TGF-β レセプター II (TGF-β RII) の 4 遺伝子について計 6SNPs を選択し、総計 29SNPs (表 1) についてタイピングを行う。

さらに上記 29SNPs に加え、ワーファリン使用量の決定因子に関わる遺伝子多型について特に日本人における報告を中心に調査し、新たなターゲットを探る。

## 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

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。被験者が感染していた場合、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、ポリマー製コンポーネントの変質を防ぐため、滅菌はエチレンオキサイドガス滅菌とした。

### (2) 抜去インプラントの観察

入手した抜去インプラントの各コンポーネントに

ついて、目視あるいはデジタルマイクロスコープ (KEYENCE、VH-8000C) により、破損や傷などの状況を観察し、記録を行った。目視観察の記録にはデジタルカメラ (キヤノン、IXT digital 55) を用いた。

各コンポーネントは機械的に結合していることが少なくない。特にパイポラ型人工股関節など、分解が容易ではない場合は、UHMWPE コンポーネントを切断し、分解した。また、骨セメントが付着している場合は、これを除去した。各コンポーネントの観察と記録は、このような分解作業前と、各作業工程が終了するごとに行った。

コンポーネント全体の変形が観察された 1 例では、変形の状況を記録するため、非接触式三次元形状測定機 (コニカミノルタ、VIVID 9i) により 3 次元形状を測定した。

### (3) UHMWPE コンポーネントの FTIR による分析

UHMWPE コンポーネントの物性についてフーリエ変換式赤外分光光度計 (FTIR) を用いて測定した。UHMWPE コンポーネントをバンドソー (ホーザン、K-100) で切断後、回転式マイクロトーム (大和光機工業、PR-50) により厚さおよそ 200 μm の試料を切り出した。試験片は摺動面に垂直に切り出した。また、人工股関節の場合は、リム部分の測定も行い、この場合はリム端面に垂直に試験片を作製した。FTIR (日本電子、SPX200) に顕微ユニット (日本電子、顕微赤外ユニット IR-MAU110) を取り付け、透過モードで測定した。アパーチャーサイズを 100 x 100 μm、スキャン回数を 8 回とした。測定は摺動面あるいはリム端面から 100 - 500 μm ごとに行った。(物性の変化が大きいと思われる表面付近は密に、小さいと思われる内部は疎に測定を行った。)

測定結果より酸化度、結晶化度、トランスビニレン指数を計算し、それぞれ深さ方向のプロファイルを作成した。酸化度とトランスビニレン指数の計算方法は ASTM に従った。結晶化度の計算方法は以下のように行った。

$$\text{結晶化度 [\%]} = \alpha / (\alpha + 0.25) \times 100$$

$$\alpha = A1896 / A1305$$

ただし、A1305 と A1896 はそれぞれ 1305 cm<sup>-1</sup> と 1896 cm<sup>-1</sup> 付近におけるピーク面積である。

本研究では酸化度と結晶化度についてはコンポーネント中の最大値を使用した。トランスビニレン指数は、計算の元になるピークが小さく、ばらつきが大きくなりやすいこと、コンポーネント内部ではほぼ一定であると考えられることから、本研究ではコンポーネントごとの平均を使用した。抜去インプラントとは別に 25、50、100 kGy でガンマ線照射した試料を試作し、そのトランスビニレン指数から、抜去インプラントが受けたガンマ線照射の有無およびお

およその線量を推定した。

#### (4) 脂質による影響の検討

UHMWPE には、生体内で生体成分（主に脂質）が進入し、それらが酸化度を算出するために使用される領域において赤外線吸収を示すため、酸化度の算出に影響を与えることが報告されている。具体的には、脂質によるピークは  $1740\text{ cm}^{-1}$  付近に観察され、酸化によるピークは  $1712\text{ cm}^{-1}$  付近と  $1716\text{ cm}^{-1}$  付近に観察される。本研究でも  $1740\text{ cm}^{-1}$  付近にピークが散見され、そのような影響を示唆する結果が見られたため、脂質を除去する方法について検討を行った。具体的には、以下に示す方法で各試験片を順に洗浄し、各工程後のピーク面積とそこから算出される酸化度の変化を調べた。

- (イ) 常温のヘキサンに一晩浸漬
- (ロ) (イ) の繰り返し
- (ハ) ヘキサンで一晩煮沸
- (ニ) シクロヘキサンで一晩煮沸

#### (5) 臨床情報との照合および総合分析

目視観察や FTIR 測定など、これまでに得られた情報と、臨床情報を統合し、症例ごとに不具合要因について考察を行った。

### 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

FDA のオンライン対話型検索では、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、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）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。具体的には、年と各項目などとのクロス集計で解析を行った。

また、今回は、製品に問題があるとされた報告、Adverse Event を生じた事例を取り上げ、その中でも頻出する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の不具合内容数について解析を行った。

また、厚生労働省の薬事・食品衛生審議会に報告された不具合要約例（2003/8～2008/9、5 年分、6 万 3 千件強）を機器別に整理した。

### 7. 吸収性材料（人工硬膜）による長期生体影響のリスクアセスメント手法開発

#### (1) 実験動物

実験動物は雄の 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）、モデル人工硬膜品として汎用される濃度の OT 含有 PLGC 膜埋め込み群、高濃度 OT 含有 PLGC 膜埋め込み群、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜埋め込み群の 4 群に分けた（ $n=11$ /群、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜埋め込み群のみ  $n=10$ ）。

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  $22^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 45% であった。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) PLGC 膜

モデル品は、汎用される濃度の OT 含有 PLGC 膜で、三重膜の構造をもった厚さ  $300\text{ }\mu\text{m}$  のもので、触媒としての OT の濃度はスズ濃度で最大 20 ppm を作製した。高濃度 OT 含有 PLGC 膜は厚さは  $300\text{ }\mu\text{m}$  とし、残存スズの濃度を 200 ppm とし、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜は、同様に構造は三重膜で、厚さは  $300\text{ }\mu\text{m}$  とし、残存スズの濃度を 100 ppm としてテーラーメイドで作製した。三種類の膜ともに、清潔下に約  $6.5\text{ mm}$  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。

モデル品 PLGC 膜の重量の平均値  $\pm$  標準誤差は  $14.8 \pm 0.6\text{ mg}$ 、高濃度 OT 含有 PLGC 膜の重量の平均値  $\pm$  標準誤差  $12.7 \pm 0.8\text{ mg}$ 、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜の重量の平均値  $\pm$  標準誤差  $13.6 \pm 0.4\text{ mg}$  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 群  $376.0 \pm 15.7\text{ g}$ 、モデル品 PLGC 膜埋め込み群  $348.5 \pm 10.3\text{ g}$ 、高濃度 OT 含有モデル品 PLGC 膜埋め込み群  $356.7 \pm 7.6\text{ g}$ 、高濃度 DBT 含有モデル品 PLGC 膜埋め込み群  $354.5 \pm 7.6\text{ g}$  であった。

ラットに腹腔内投与麻酔を行い脳定位固定装置（SR-6R, Narishige）に固定した。ラット用補助イヤパ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）を用い、内径  $8\text{ mm}$  のポントレフィンバー BTB-80（長谷川メディカル）を用いて、頭蓋骨から直径  $8\text{ mm}$  の円形の頭蓋骨片をくり抜いた。穴より、モデル品 PLGC 膜か、高濃度 OT 含有 PLGC 膜、または高濃度 DBT 含有 PLGC 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で縫合した。術後 1 週間、手術部位を消毒し、抗生物質犬猫用バイトリル 2.5% 注射液を  $5\text{ mg/kg}$  の用量で腹腔内注射を行った。術後 2 ヶ月、同じ群から 2 匹ずつ一つのポリ