

カーカーボネート製のケージに入れ飼育した。ラットの体重を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2ヵ月後、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)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、尿で判断)を記録した。

#### (5) 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。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であった。装置の驚愕反応チェンバーは、ラットホルダー底面にセンサーを装備し、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、バックグラウンド音は白色騒音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。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測定値の平均値と、PP70&P, PP75&P, PP80&Pについて測定した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

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

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

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

#### (6) 試験後の脳の肉眼的観察、膜回収

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

ラット体重に関して群毎の平均値を算出し、一元配置分散分析(ANOVA)で比較し、post hoc testにはStudent-Newman-Keuls法を用いた。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同様にANOVA及びStudent-Newman-Keuls法で比較した。

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

モデル構築の手順に従い、成人男性の下肢のCT画像、MRI画像を用いて3次元生体膝モデルの構築を行った。まず、骨構造解析ソフトウェア Mechanical Finderを用いてCT画像のCT濃度値を基に生体骨(大腿骨、脛骨、膝蓋骨)の輪郭を抽出し、外形メッシュデータの生成を行った。次いで、リバースモデリングソフト Rapidform XOR2を用いて外形メッシュデータの表面にサーフェスを作成することで、生体骨の3次元ソリッドモデルを作成した。また、MRI画像に関しても同様の作業を行うことで、軟組織(膝蓋腱、膝蓋靭帯、内側側副靭帯、外側側副靭帯)の3次元ソリッドモデルを作成した。次に、汎用有限要素法プリ・ポストプロセッサ FEMAP を使用して、生体骨と軟組織の3次元ソリッドモデルを組み合わせることで詳細な3次元生体膝モデルを構築した。一方で、現行のPS型人工膝関節のCADデータを基に、ステム部分を取り除き簡易化した人工膝関節の3次元モデルを作成した。最後に、生体膝モデルに人工膝関節のモデルを組み込むことで、TKA後の生体膝モデルへと発展させ、4節点4面体要素で構成される有限要素解析モデルを構築した。節点数は32743、要素数は147146である。

本解析では、UHMWPE製の脛骨インサートを弾塑性体( $E=800\text{MPa}$ ,  $\nu=0.4$ )と仮定し、応力-ひずみ関係が3直線で近似されるモデルを用いた。また、各軟組織は弾性体( $E=1\text{MPa}$ ,  $\nu=0.49$ )とした。UHMWPEより遥かに剛性の高い生体骨と金属コンポーネントは剛体として取り扱った。大腿骨コンポーネント、脛骨インサート間の摩擦係数は0.04とした。境界条件として、大腿骨部分は鉛直方向以外の変位を拘束して鉛直方向から荷重FNを加え、脛骨部分は水平方向以外の変位を拘束して水平方向から荷重FTを加えた。なお、屈曲と共に変化する荷重FN、FTはスクワット運動に対応している文献を参考にした。これらの条件の下、生体膝の屈曲動作の再現を行った。解析には陽解法動的有限要素解析ソフト LS-DYNAを用いた。

## 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

### (1) 血流と数値流体解析の整合性

#### 1-1 血流の流速測定

超音波画像診断装置によって、通常の医療現場で行われている手法で血流測定を行った。内頸動脈



(ICA)は、分岐部から 20cm 下流側を測定部とした。外頸動脈の測定部位は、再構築した外頸動脈で断面面積が最小の部分とした。総頸動脈は分岐部より 20cm 上流部を測定部位とした。

### 1-2 3次元形状の再構築

対象を頸動脈分岐部(65歳, 男性)に設定した。3次元の血管形状をCTより再構成した。

撮影画像はDICOMデータとして保存し、Mimics7.3(Materialise)およびMagics8.05(Materialise)を用いてSTLフォーマットに再構築を行った。

再構築した形状を数値流体計算するため、東北大学流体科学研究所未来流体情報創造センター所有のスーパーコンピュータ(シリコングラフィックス, SGI)上に転送し、Gambit2.2.30(Fluent)にてメッシュを形成した。

### 1-3 数値流体計算

数値流体計算に用いた血流は、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 [kg/m<sup>3</sup>]、粘性は 0.0035 [Pa 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。

インレット(入口, CCA)およびアウトレット(ICAおよびECA)の条件をまとめた。数値解法には数値解析ソルバであるFluent6.2(フルーエント社)を使用した。

## (2)ステントストラットが血流に与える影響

### 2-1 ステントストラットと脳動脈瘤の形状構築

ステントストラットが血流に与える影響を調べるために、まず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[°/sec]で 180[°]回転させた。その間 12.5[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[kV]、40[μA]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 5.76×5.76×4.77 [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。脳動脈瘤のネックの部分におけるステント設置位置にある。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。さらに、ステントストラットが血流に与える影響を調べるため、ステントストラットを削除し、血流の状態を観察した。

### 2-3 数値流体解析

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 [kg/m<sup>3</sup>]、粘性は 0.0035 [Pa 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[m/s]の一様流を設定した。出口端では圧力 0[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Fluent6.2(フルーエント社)を使用した。

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

### 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

#### (1)人工股関節の形状モデル作成

光学式三次元形状測定装置 VIVID 9i (コニカミノルタセンシング株式会社)を使用して人工股関節大腿骨コンポーネントの形状測定を行った。今回測定対象としたのは 4-U 人工股関節(ナカシマメディカル株式会社)である。測定原理上、VIVID 9i はサンプル表面で光が散乱する状態でなければ良好な測定精度が得られない。4-U 人工股関節の大腿骨コンポーネントは部分的に金属光沢面があり、そのままでは計測が困難であるため、微細なセラミック粒子をステム全体にスプレー塗布することで測定に適した表面状態にした。VIVID 9i と連動する回転テーブルを併用した自動測定や、手作業での反復測定を繰り返して測定対象各部の表面形状ポリゴンデータを得た。

得られた複数の表面形状ポリゴンデータをリバーシモデリングソフトウェア RapidForm XOR2 (INUS Technology, Inc.) (以下、RapidForm と略記)を使



用してつなぎ合わせ、サンプル全体の表面形状ポリゴンデータを作成した。さらに、RapidFormの機能を利用して、ポリゴン表面に自由曲面を生成し形状モデルを作成した。

#### (2) 血管内ステントの形状モデル作成について

Cordis社のCYPHERステントを入手し、形状モデル作成を試みた。血管内ステントのストラット(梁)断面幅は100 $\mu$ m~200 $\mu$ m程度であるため、測定精度が50 $\mu$ mのVIVID 9i(TELEレンズ使用時)では血管内ステントの形状を精度良く測定することはできない。そこで、マイクロフォーカスX線CT TOSCANER-30000(東芝ITコントロールシステム株式会社)(分解能4 $\mu$ m以上)を使用して形状計測を行った。

#### (3) 歯科用骨固定材の形状モデル作成および力学シミュレーション

##### 3-1 形状モデル作成

測定対象としたのは、Stryker社製の歯科用骨固定材56-28087である。人工股関節の形状測定と同様にしてVIVID 9iによる形状測定を行った。また、RapidForm XOR2による形状データの連結と曲面生成も人工股関節と同様に行って骨固定材全体の形状モデルを作成した。

##### 3-2 医師による塑性変形を想定した力学シミュレーション

医師が下顎骨の欠損を補うために骨固定材を使用する際、医師は患者の下顎骨の形状や状態に合わせて骨固定材を変形させて使用する。そのため、実際にどのような変形操作が行われるのかは各医師・各手術で異なる。そのため本研究では、変形操作例として、骨固定材の部分形状に段階的に様々な荷重をかけた境界条件を設定し、その際どのような塑性変形や残留応力が生じるかを調べることにした。使用した部分形状モデルと境界条件を図19に示す。境界条件は、一方の端を対称境界条件(下端は完全固定)とし、第1ステップとして他端上面に5kg~60kgの荷重をかけ弾塑性解析を行った。そして、第2ステップで荷重を除荷し、塑性変形による残留応力を求めた。

有限要素解析モデルの作成に当たっては、まずRapidForm上で骨固定材全体の形状モデルから中間の対象部分を切り出し、Parasolid形式のファイルを経由してFEMプリプロセッサFemap(Siemens AG)にインポートした。Femap上で材料定数の設定・第1ステップの境界条件設定・メッシュ生成を行った後、ANSYS 10.0で弾塑性有限要素解析を行った。メッシュ分割は四面体二次要素で行い、要素数28616、節点数18883のメッシュを計算に用いた。初期条件として、残留応力は考慮しなかった。次いで、第2ステップとして、ANSYS上において、荷重境界条件を設定していた節点の荷重値を0に変更し、リスタート計

算を行った。

材料の弾塑性挙動は、応力-ひずみ曲線が弾性域と塑性域の2直線で近似されるものと仮定した。すなわち、材料は降伏後、ひずみ量に応じて線形硬化するものとした。材料定数は、骨固定材の材質をTi-6Al-4Vの焼きなまし材と仮定して、弾性係数を113 GPa、ポアソン比を0.3、降伏応力を900 MPa、塑性変形時の接線係数を11.3 GPaとした。

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

##### (1) 不具合報告のまとめ

「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)の2004年7月から2007年7月までの資料より、カテーテル・チューブの不具合状況をまとめる。また、ガイドワイヤーの不具合報告の内訳について2005年4月から2007年9月までの資料をもとにまとめる。

##### (2) ダイレータ・ガイドワイヤーによる血管穿孔可能性を調査する新試験法の開発

###### 2-1 ダイレータの挿入力調査

血管内にガイドワイヤーを挿入し、ダイレータを用いて挿入口を広げるときの押し込み力(ダイレータの挿入力)を計測する。デジタルフォースゲージのアダプターにダイレータを差し込み、臨床時と同じぐらいの力で押す。被験者は医師4名で経験年数は2, 5, 12, 年である。12年の医師は2名とした。

###### 2-2 本試験の対象となる臨床状況

本試験で再現を行う臨床におけるダイレータの挿入手順は以下のとおりである。

- 1) 穿刺針により経皮的に血管壁を穿刺
- 2) 穿刺針の内腔を通して、ガイドワイヤーを血管内に留置
- 3) 穿刺針の抜去
- 4) ダイレータ内腔にガイドワイヤーを通し、対象位置までダイレータを挿入

本試験では頸静脈がすでに血管内にガイドワイヤーを挿入済みで新たにダイレータを挿入したときを模擬する評価系を構築し、試験を行った。

###### 2.3 試験装置

引張試験機(AGI-250kN, Shimadzu Corp.)上部に許容最大荷重50Nのロードセル(SLBL-50N, Shimadzu Corp.)を、また、引張試験機下部には頸静脈固定専用治具を取り付け、計測系を構築した。ここに示す $\theta$ がダイレータの試験片に対する挿入角度であり、15°から60°まで15°毎の可変とした。プタ頸静脈は走行方向に約40mmの長さにそろえ、周方向についた脂肪組織を取り除いた。切開して内皮を露出させ



た状態で治具に装着し、治具に挟み込んだ上で、引張試験機に固定した。ここで、データ収録には引張試験機と直結した Windows Desktop PC を用いた。

2.4 頸静脈穿孔荷重試験：静脈片とダイレータの角度を $\theta$ とした際、 $\theta$ に対する穿孔時荷重を計測する。

(1) プタ頸静脈を切開して内皮を露出させた状態で治具に装着し、引張試験機に固定する。

(2) 引張試験機に許容最大荷重 50N のロードセルを設置する。

(3) ダイレータにガイドワイヤーを通し、引張試験機の上部にダイレータをチャックする。この際、ダイレータのチャック箇所はダイレータの先端から 100mm とする。ガイドワイヤーの端部(ダイレータ側)は試験時にダイレータと共に移動しないよう別途固定する。

(4) ガイドワイヤーを頸静脈血管上に走行させ、治具に配備したガイドワイヤー孔に挿入する。

(5) ダイレータ先端の頸静脈への接触部位を確認し、頸静脈片とダイレータの角度 $\theta$ が $15^\circ$ となるよう治具の角度を調整する。

(6) ガイドワイヤーを通したダイレータの先端が頸静脈片の上方 10mm 程度の位置まで移動させる。

(7) ガイドワイヤーダイレータ、及び頸静脈片を生理食塩水で湿潤させる。また試験中を通してこの状態を保つよう配慮する。

(8) ダイレータを頸静脈片が穿孔するまで試験速度 500mm/min で下方に変位させる。この際、サンプリング周波数は 20Hz としデータを記録する。頸静脈片が穿孔しなかった場合は、ダイレータが 20mm 変位したところで試験を終了する。この際、ガイドワイヤーの状態も併せて観察する。

(9) (8)の手順が終了後、ダイレータ、ガイドワイヤー及び頸静脈を交換し、頸静脈片 3 本に対して上記(3)~(7)を繰り返す。

(10) (3)~(9)の手順にて頸静脈片とダイレータの角度 $\theta$ を $30^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $60^\circ$ とした試験を実施する。

2.5 頸静脈すべり角度試験：穿孔が起こらない頸静脈-ダイレータ間の角度 $\phi$ を同定する。

(1) C.4 の(1)-(4)と同様の設定を行う。

(2) ダイレータ先端の頸動脈への接触部位を確認し、水平方向に対して頸静脈片とダイレータ間の角度を $\phi$ とし、以下に準じて治具の角度を調整する。

C.4 の試験で穿孔した角度 $\theta$ に対して $\phi = \theta - 5$ とする。

・ $\theta = 45^\circ$ で穿孔し、 $\theta = 30^\circ$ で穿孔しなかった場合、 $\phi = 40^\circ$

・ $\theta = 30^\circ$ で穿孔し、 $\theta = 15^\circ$ で穿孔しなかった場合、 $\phi = 25^\circ$

・ $\theta = 15^\circ$ で穿孔した場合、 $\phi = 10^\circ$

(3) ガイドワイヤーを通したダイレータの先端が頸静脈片の上方 10mm 程度の位置まで移動させる。

(4) ガイドワイヤーダイレータ、及び頸静脈片を生理食塩水で湿潤させる。また、試験中を通してこの状態を保つよう配慮する。

(5) ダイレータを下方に変位させ、頸静脈の穿孔の有無を確認する。同時にガイドワイヤーの状態も観察する。

(6) 穿孔した場合、上記(2)の手順で設定した角度 $\phi$ をさらに $5^\circ$ 減じた角度とし、(3)~(5)を繰り返す。

## 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

### ①化学物質

Polymer は以下の種類を用いて実験を行った。P1 [poly ( $\epsilon$ -lactide-glycolide copolymer, PLLG, without a catalyst), the average number of molecular weights (Mn) = 3,540], P2 [poly ( $\epsilon$ -lactide-glycolide copolymer, PLLG, with SnOct<sub>2</sub>), Mn = 3,580], P3 [poly ( $\epsilon$ -lactide-caprolactone copolymer, PLLC, without a catalyst), Mn = 3,550], and P5 [poly ( $\epsilon$ -lactide-glycolide copolymer, PLGA, without a catalyst), Mn = 3,110]. すべての polymers はテララーメドで合成した。アセトンとオリーブ油を 4 : 1 の比率で混ぜた媒体を作り、それぞれの polymers を 0.5%, 1%, 3%, 5% になるよう溶解し、実験を行った。

### ②動物

動物実験は OECD test guideline に従って動物を維持及び管理した。7-10 歳の CBA/JNCrlj female mice は Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) から購入した。マウスは一ケージに 3 匹で飼育し、一週間の馴化後実験に使用した。

### ③Local lymph node assay (LLNA)

陰性対照群(媒体対照群)、試験物質群(0.5%, 1%, 3%, 5% : 4 用量)、陽性対照群(0.5% (W/V) 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB))を一セットとして実験を行った。予備検討の結果、ポリマーのみでは皮膚感作性の反応が弱かった為、0.01%(w/v)の DNCB (この濃度では陽性にはならない)とポリマーを混合して以下の実験を行った。陰性対照、試験物質、陽性対照をそれぞれ 25・L マウスの両耳介に 1、2、3 日目に連続で塗布した。6 日目に 0.5ml の BrdU を腹腔内投与し、7 日目にマウスを安楽死させ、local lymph node cells (LCs)を抽出した。処理の前後でマウスの重さを計って各群間の体重変化を比較した。各マウスの LCs は個別に 40・M nylon cell strainer



(BD Falcon, Billerica, MA, USA)を用いて細胞をばらし、15mlのPBSに再浮遊させ、その100ulを使用してBrdU ELISA kit (chemiluminescence, Roche, Indianapolis, IN, USA)を用いてBrdUの取り込み量を測定した。ポリマーP3では残りのリンパ球をDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)に10% fetal bovine serum (FBS; Intergen, Purchase, NY, USA)を添加した培地で24時間培養し、その上清中のcytokinesの測定を行った。Cytokine assayはmouse Th1/Th2 cytokine kit BD™ Cytometric Beads Array (CBA Kit, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)を用いて測定した。

### 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

本年度は、昨年度採用した金表面への自己組織化膜形成を利用した官能基表面を利用したモデル表面の作製を重点的に行った。

基材としては、マツナミ社製の円形カバーガラス(15mm径、厚さ0.2mm)の片面に3nmのチタン層をコートした後に25nmの金属をコートしたものをを用いた(村中医療器製)。

この基材を、Pirahna溶液(濃硫酸と過酸化水素水を3対1で混合した溶液)及び純水で洗浄、乾燥後、エタノール中で片末端にチオール基、もう片末端に種々の官能基を持つ市販のdecanethiol類と反応させることでモデル表面を調製した。今年度は市販品として入手できる試薬のみを使用した。今回、調製可能であった官能基表面は以下の5種類である。

1) メチル基、2) カルボキシル基、3) アミノ基、4) 水酸基、5) リン酸基

過去に、細胞の接着や接着直後の遺伝子発現変化が、材料表面の水に対する接触角に影響されることが報告されている。昨年度の研究では、単一の官能基をもつ表面上での細胞挙動変化を検討したが、それらの表面では、表面に露出している官能基の種類が異なるだけでなく、その種類の違いに応じて接触角が異なることも明らかとなっている。よって、観察された挙動変化は、これらの2つの要因のいずれにより大きな影響を受けているのかが明確でない。すなわち、細胞挙動変化の機構を明らかにするためには、官能基・細胞間相互作用と接触角(表面自由エネルギー)・細胞間相互作用のいずれが、あるいは両者がどの程度の割合でその変化を支配しているのか、を明らかにしなければならない。そこで、今年度は、官能基以外の表面特性指標である水に対する接触角の影響を検討する目的で、単一表面に加え2種類の官能基をもつ表面を調製した。できるだけ、幅広い接触角をもつ表面を調製する目的で、メチル基用試薬に対して他の試薬を種々の濃度で混合した

エタノール溶液を用いて、種々のモデル表面を作製した。

具体的には、1mMのundecanethiol溶液に他の試薬1mM溶液を種々の比率で混合した溶液を用意し、そこに基材を24時間浸漬後、洗浄、乾燥を行い、デシケータ内に保存した。モデル表面の接触角をSessile drop法で、表面に存在する元素をESCAで測定することで、調製したモデル表面の状態を確認した。

種々の官能基表面が細胞挙動に与える影響を検討するため、調製した各種モデル表面上に市販のヒト正常骨芽細胞(NH0st)を培養し、その増殖と分化程度を評価した。10%FCSを含む $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -MEM-10FCS)で継代培養したNH0stを所定数各種モデル表面上に播種した後、骨分化誘導因子(s-glycerophosphate、dexamethasone、ascorbic acid)を添加した、あるいは無添加の $\alpha$ -MEM-10FCSで1週間培養を行い、所定期間毎に細胞数とALP活性をそれぞれ測定した。細胞数の指標としては、培地中にTetracolor One試薬を一定濃度になるように添加して3時間後に測定された吸光度を用いた。また、ALP活性は既報に従って測定用試薬中で所定時間培養した試薬の吸光度から、既知濃度のALP試薬で得られた吸光度を基にその値を算出した。それらの結果を比較検討し、官能基及び接触角が細胞挙動に与える影響について考察を行った。

## C. 研究結果

### 1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

#### (1) 血清蛋白質の回収量

牛胎児血清からは34.1 mg/mlの蛋白質が回収された。スルホン化トレイからは、1枚当たり全血清蛋白質の0.4%程度に相当する3,468・gの蛋白質が回収されたが、未処理の対照トレイから回収された蛋白質量は4.5・gであり、対照トレイは血清蛋白質を殆ど吸着しないことが確認された。

#### (2) 吸収血清を用いた培養実験

通常牛胎児血清(未吸収血清)、対照吸収血清及びスルホン化プレート吸収血清を使用してNH0stを培養した時の増殖能及び分化能(ALP活性)を評価した。通常細胞培養プレート上で培養した場合(図1下段)、対照吸収血清使用時の増殖能とALP活性は未吸収血清使用時と同等であり、両活性ともに経時的に増加したが、スルホン化プレート吸収血清使用時には増殖能及び分化能ともに顕著に抑制されることが判明した。また、図1上段に示すように、NH0stの分化促進機能を持つスルホン化プレート上で培養した場合でも同様の傾向が認められ、対照吸収血清は未吸収血清と同等の挙動を示したが、スルホン化プ



レート吸収血清使用時には増殖能及び分化能ともに低下することが確認された。

### (3) スルホン化プレート吸着蛋白質の同定

#### 3-1. 二次元電気泳動解析

血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の二次元電気泳動解析結果を図2に示した。図2Aは等量の両蛋白質を混合し、Cy2で蛍光染色したゲル間マッピング用の内部標準試料である。図2DはCy3標識血清蛋白質の泳動像(図2B)とCy5標識スルホン化プレート吸着蛋白質の泳動像(図2C)を重ね合わせた画像であり、血清蛋白質試料とスルホン化プレート吸着蛋白質試料中に等量存在する蛋白質は黄色スポット、血清蛋白質試料と比較して、スルホン化プレート吸着蛋白質試料中の含有量が高い蛋白質は赤色スポット、逆に血清蛋白質試料に多く含まれる蛋白質は緑色スポットとして検出されている。

血清蛋白質の二次元電気泳動(図2B)では、アルブミン(MW=71,244, pI=5.82)をはじめとした幾つかの蛋白質の含有量が非常に高いため、微量蛋白質のスポットが殆ど検出されていない。一方、スルホン化プレート吸着蛋白質(図2C)では、試料中に存在する蛋白質成分のダイナミックレンジが狭まり、血清蛋白質試料において殆ど検出されなかったスポットも顕著に観測されることが判明した。DeCyder 2Dソフトウェアにより解析した結果、血清蛋白質試料と比較して検出量が5倍以上増加しているスポット数は146個であり、現在、これらの蛋白質の同定作業を進めている。

#### 3-2. LC-MS/MS ショットガン解析

血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の同定をnano-flow LC-MS/MS解析により行い、その結果を表1に示した。血清蛋白質試料からは、血清中に多量に含まれるALBU、A2MG、APOA1、APOH、FIBA、TTHY、溶血に由来するHBA及びHBBFをはじめとして、20種類の蛋白質が同定された。スルホン化プレート吸着蛋白質試料のショットガン解析では42種類の蛋白質が同定され、血清中に存在する雑多な蛋白質のほか、機能性蛋白質(IGF2、IBP2、TETN)や細胞外マトリクス(CO1A2、COMP、FINC、HABP2)など興味ある蛋白質が検出された。一方、スルホン化プレート吸着蛋白質を等電点電気泳動により分画した後にショットガン解析を行った結果、蛋白質のID数は72種類まで増加し、ダイレクトショットガン解析において検出されなかった機能性蛋白質及び細胞外マトリクスとして、MIME、TGBR3、SPP24、CO1A1などが同定された。

## 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) PS粒子の細胞毒性

平均直径0.1 - 9.2  $\mu\text{m}$ までの11種のPS粒子の細胞毒性を31.25 - 500  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で検討した。その結果図3に示すように、0.1 - 0.51  $\mu\text{m}$ の小さい3種のPS粒子はほとんど細胞毒性を示さなかった。より大きな8種のPS粒子はいずれも最高濃度500  $\mu\text{g/ml}$ では強い細胞毒性を示していたが、4.45  $\mu\text{m}$ のPS粒子が11種のうち最も強い細胞毒性を示した。小さい3種のPS粒子のより高濃度での細胞毒性を確認するために、また、細胞毒性がより強かった8種のPS粒子間の細胞毒性を比較するために特定の処理濃度での細胞毒性試験を実施した。その結果図4に示すように、0.1および0.2  $\mu\text{m}$ のPS粒子では、1000  $\mu\text{g/ml}$ で処理してもほとんど細胞毒性を示さないことが判明した。また、100  $\mu\text{g/ml}$ で処理した8種のPS粒子の比較から、最も強い細胞毒性を示すのは4.45  $\mu\text{m}$ の粒子で、次に2.07と3.17  $\mu\text{m}$ 、その次に0.92と1.09  $\mu\text{m}$ のPS粒子で、単純に一方方向に粒子径と細胞毒性の関係があるのではないことが明らかとなった。

### (2) PS粒子の表面解析および分散媒の性状

上記毒性試験の結果、図4に示すように4.45と5.26  $\mu\text{m}$ のPS粒子間で細胞毒性に大きな開きが認められた。いずれの粒子も、毒性試験終了時には白い沈殿が細胞を覆うように存在し、また、粒子径の違いも僅かであることから、PS粒子製造時の表面分子構造の違い、あるいは分散媒の成分の違いがあるのではないかと疑われた。この疑問を解決するために、PS粒子の表面解析(図5左)および分散媒成分の分析(図5右)を行った。その結果、4.45と5.26  $\mu\text{m}$ のPS粒子は表面分子構造も分散媒の成分もほとんど同じで、図4でみられた細胞毒性の違いは粒子径の違いに起因することが明らかとなった。分散媒の分析で、 $\text{Na}^+$ が検出されているが、これは保存剤として添加されている0.02%の $\text{NaN}_3$ に由来するものである。

### (3) PS粒子の染色体異常試験

ナノマテリアルの安全性評価で実施する予定の染色体異常試験を、PS粒子についても実施した。

まず、僅かな粒子径の違いで細胞毒性に大きな違いが認められた4.45と5.26  $\mu\text{m}$ のPS粒子について、染色体異常試験を実施した。その結果、図6のような染色体数的異常(倍数体)が観察され、集計の結果、表2および表3に示すように、倍数体の誘発で陽性という結果になった。処理濃度および倍数体誘発頻度から、4.45  $\mu\text{m}$  PS粒子の方が明らかに強い陽性結果を示した。染色体構造異常はほとんど誘発されなかったため、他のサイズのPS粒子についても倍数体誘発性を確認するために、48時間処理のみの染色体異常試験を実施した。11種すべてのサイズのPS



粒子の48時間処理後の倍数体出現頻度を図7に示す。使用しているCHL細胞の陰性対照での倍数体出現頻度は、平均値約1%、最大値4%であることから、10%以上を陽性と判定している。0.92 - 4.45・mのPS粒子は、実施した複数の濃度すべてで倍数体の誘発において陽性結果を示した。

#### (4)PS粒子の細胞内への取り込み

昨年度の本研究において、蛍光標識PS粒子(2・m)の細胞内取り込みを共焦点顕微鏡で観察し、細胞内へ1個の粒子が取り込まれている事を示した。共焦点顕微鏡観察では多数の細胞の観察には時間を要するため、本年度はSEMを使ってPS粒子の細胞内への取り込みを観察することにした。図8にその画像を示す。これは、最も強い細胞毒性を示し、倍数体誘発性も高かった4.45・mPS粒子で24時間処理後、2回リンスし観察したCHL細胞の写真である。左側1000倍で撮影した写真の一部(点線で囲まれている部分)を3000倍で観察したものが右の写真であるが、中央にある2つの細胞(上の細胞は1個の粒子を、下の細胞は4個の粒子を貪食している)をよく見ると、粒子が細胞膜で覆われていることがわかる。左の写真に戻ってみると、裸の粒子(白矢印)と細胞膜で覆われている粒子の識別が可能で、細胞によっては驚くことに10個以上もの粒子を貪食していることがわかる。

#### (5)フローサイトメトリーによるPS粒子取り込み細胞の半定量的測定

SEM観察の結果、4.45・mPS粒子がほとんどの細胞に取り込まれている事が判明し、処理後リンスし位相差顕微鏡で観察した画像とよく一致していることが確認できた。

位相差顕微鏡観察において、4.45・mと5.26・mPS粒子の細胞内取り込みは、取り込んでいる細胞数、および1細胞あたりの取り込み数が大きく異なることはすでに観察していた。この取り込み量の違いを、定量的あるいは半定量的に測定するために、細胞内への粒子の取り込みが、細胞の内部構造の変化としてフローサイトメーターの側方散乱光で識別できないかと考えた。

まず、3.17・mのPS粒子を用いて、位相差顕微鏡で観察できる細胞内取り込み状態と、側方散乱光のデータとに相関性があるかを検討した。3.17・mPS粒子も、細胞毒性が強く高頻度の倍数体を誘発する粒子である(図4、7)。図9にその結果を示す。上の写真はPS粒子24時間処理後にリンスして観察した位相差顕微鏡の画像である。Controlでは細胞の輪郭内に粒子はみられないが、処理群では細胞の輪郭内に粒子が観察される。粒子が観察される細胞数、および1細胞内の粒子数は200・g/ml処理群の方が

多い。図9下図はそれぞれの細胞を回収してフローサイトメーターで解析した、前方散乱光(FSC-H)と側方散乱光(SSC-H)のデータである。図中のドット一つが、1細胞の情報を示しており、この図は20,000個の細胞の情報が示されている。3群でFSCの変化はほとんどないが、SSCは処理濃度が高くなるにつれ値が大きくなっている。SSCの変化に対して細胞数をプロットしたものが、図9下右端のカラーのグラフである。Control(Medium)で観察されるSSCは細胞が本来もっている核や細胞内小器官、顆粒等に由来していると考えられる。ところが、PS粒子処理群では正常な細胞の数は減少し、さらに大きな値のSSCを示す細胞数が増加している。PS粒子の処理濃度に比例してより大きなSSC値の細胞数が増加している。細胞内への粒子取り込みと相関したSSC値の増大、および対応する細胞数の変化がみられることから、この方法で少なくとも取り込み量の相対的比較は可能と考えた。そこで、同じ手法を用いて4.45・mと5.26・mPS粒子の取り込み量を比較した。

図10に回収時の細胞と粒子量の様子を、図11にフローサイトメーターでの解析結果を示す。4.45と5.26・mPS粒子の取り込み量は、同じ処理濃度では明らかに5.26・mの方が少ないことはわかっていたので、いずれも倍数体が誘発される濃度付近での処理を行った。図10から、どちらのサイズのPS粒子でも、低濃度では、一部の細胞内に1個から数個の粒子が観察され、中濃度ではほとんどの細胞内に数個以上の粒子が観察され、高濃度では細胞の形態も丸くなり傷害を受けている様子が観察される。これらの細胞を回収し、20,000個の細胞の解析結果をSSC値に対しての細胞数で示したものが図11である。いずれのサイズでも濃度依存的に正常細胞のSSC値を示す細胞が減少するとともに、SSC値は増大している。5.26・mPS粒子では、中濃度と高濃度でのグラフの変化が小さく、取り込みが飽和状態に達してきていることが示唆される。4.45・mPS粒子の方がより低濃度でより大きなSSC値を示す細胞が検出されており、CHL細胞は4.45・m粒子を好んで貪食する傾向が示唆された。

### 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

#### (1)デジタル顕微鏡観察

ハンクス平衡塩溶液浸漬後の試料表面をデジタル顕微鏡観察したところ、表面処置していない試料はいずれも析出物が観察されず、金属表面の研磨痕がはっきりと確認できた。一方、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V及びTiは、いずれの表面処理においても析出物が観察されたが、Ti-Zr-8Nb及びZrは、NaOH+Ca(OH)<sub>2</sub>処理においてのみ析出物が観察された。特に、カルシウム導入のためにNaOH+CaCl<sub>2</sub>処理及びNaOH



+Ca(OH)<sub>2</sub> 処理した Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、試料全面を析出物が覆っていた。また、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb 及び Nb は、いずれの表面処理においても析出物が観察されなかった。

#### (2) 走査型電子顕微鏡観察

ハンクス平衡塩溶液浸漬後の試料表面を SEM 観察したところ、表面処置していない試料はいずれもアパタイトの形成が確認されなかった。一方、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、いずれの表面処理においても試料全面を覆うアパタイトの形成が観察され、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においてのみ試料全面を覆うアパタイトの形成が確認された (図 2)。また、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb 及び Nb は、いずれの表面処理においてもアパタイトの形成が確認されなかった。アパタイトが試料全面を覆うほど形成されると、SEM 観察ではアパタイトの形成量を推測することは困難であった。

#### (3) 蛍光 X 線分析

試料表面のカルシウム濃度を XRF 分析で測定したところ、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、どちらのカルシウム導入法においても試料表面にカルシウムを導入できたが、NaOH + CaCl<sub>2</sub> 処理に比べて、NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の方がカルシウム導入量は約 2 倍高かった。一方、Zr は NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においてのみカルシウムを導入でき、Nb はどちらのカルシウム導入法においてもカルシウムを導入できなかった。

#### (4) フーリエ変換赤外光音響分光分析

測定条件の検討として、スキャンスピードを 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 及び 2.4 mm/sec と変化させて、ハンクス平衡塩溶液に浸漬した NaOH 処理した Ti-6Al-4V 表面に形成したアパタイトを測定した。その結果、スキャンスピードが 2.0 mm/sec の時に最も光音響強度が高く観測されたので、以後の検討はすべてスキャンスピード 2.0 mm/sec の条件で測定した。

ハンクス平衡塩溶液に浸漬した Ti-6Al-4V の FT-IR/PAS スペクトルを測定した。未処理の Ti-6Al-4V はアパタイトに由来するピークが観察されなかったが、NaOH 処理、NaOH + CaCl<sub>2</sub> 処理、NaOH + Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の順に、アパタイトに由来するピークの光音響強度が強くなった。

アパタイトのリン酸基に由来する 1050 cm<sup>-1</sup> 付近のピークの光音響強度を用いて、試料表面のアパタイト形成量を評価した。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。一方、Ti-Zr-16Nb、

Ti-Zr-24Nb 及び Nb は、いずれの表面処理でもアパタイトを形成しなかった。

#### 4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

我々がこれまでに行ってきた 29SNPs タイピングで結果を得ている。これまでに、久留米大学医学部外科学講座において人工心臓弁の機能不全が見られた患者 (2 名) および人工弁使用者で今のところ不具合が認められない患者 (8 名) の血液を用いた検討と、対照データとして健常な日本人の血液由来の DNA を用いて検討した結果を得ている。検体に用いた DNA は、PSC (ファルマ スニップ コンソーシアム) によって樹立された PSC 細胞株から調製された DNA で、100 検体用いて実験を行った。用いた検体の由来は、男性 50 名 (平均年齢 52.3 ± 8.1 才) 女性 50 名 (平均年齢 52.4 ± 8.1 才) である。今年度は、大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科より人工心臓弁使用者の血液由来の DNA を用いるために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の承認を得る手続きを行っており、現在までに人工心臓弁使用者の血液由来の DNA を得る事ができていない。また、久留米大学医学部外科学講座からも追加供与がなされていない。サンプル収集が整い次第、解析を再開する予定である。

これまでターゲットとして選定していた 29SNPs に加えて、さらに SNP タイピングの対象とすべき遺伝子多型について検討するために、ワーファリン使用量の決定に関わる多型を調査した。まず、白人 (Caucasian & European) におけるワーファリン使用量に関連する遺伝子多型として報告されているものをまとめた。しかし、ワーファリンにおける抗血液凝固療法は日本人と欧米人ではその感受性に差があるため、さらに日本人におけるワーファリン使用量に関連する遺伝子多型として報告されているものを調べまとめた。それぞれの調査対象は「ワーファリン使用者」であるが疾患は調査により様々である。その中で、心臓血管外科患者を対象 (31 名中 28 名が人工弁置換された患者) とした検討 (6) から、VKORC1 (Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene) の 1173C>T が、ワーファリン使用量と関連する遺伝子多型であることが報告されている。以上の調査結果から、白人でも日本人でもその関連が示唆されており多くの多型が報告されている遺伝子 VKORC1 について、今後本研究でも血栓形成に関する新たな SNP タイピングのターゲットとして加えていくべきであることが示された。また、GGCX も新たに検討すべき SNP の候補がいくつか示された。

#### 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

現在までに 8 例の抜去インプラントの提供が行われた。入手した抜去インプラントの一覧を表 4 に示す。このうち 5 例について解析を終了している。解析を終了したものの内訳は、人工股関節 4 例（うちバイポーラ型 3 例）、人工足関節 1 例であった。

### (2) 抜去インプラントの観察

不具合を生じたインプラントの抜去作業は困難で、金属製の工具なども使用する。特に、人工股関節では、大腿骨コンポーネントの大腿骨髄腔からの引き抜き、メタルシェルの寛骨臼からの抜去が困難である。また、バイポーラ型人工股関節では、UHMWPE 製ライナーと骨頭の分離にも困難を伴う。そのため抜去インプラントには、抜去の際に生じる傷がこれらの部分に多く残されている。深く鋭い傷は抜去の際に生じたものと推定されるが、そのような傷が多数見られた（図 12）が、不具合につながる所見ではないため、考察対象からは除外した。

これに対し、生体内における繰り返しの荷重や動作により生じる傷は、滑らかなものになると考えられる。例えば、人工股関節大腿骨コンポーネントのステム先端では、つや消し加工の一部に光沢を持つ部分が観察された（図 13）。これは、大腿骨コンポーネントのゆるみのため、周囲の骨とこすれ、摩耗が生じたためと思われる。

人工股関節の骨頭の傷は、相対する UHMWPE 製ライナーの摩耗の促進につながるため、不具合の要因となることが知られている。しかし、今回解析を行った症例では、摺動面に目立つ傷が見られたものはなかった。

人工股関節の UHMWPE 製ライナーの摺動部では、多くの症例で機械加工痕が残る部分と、平滑化して光沢が見られる部分が観察された。摺動面のうち中央部には機械加工痕がなく光沢が見られ、摺動による摩耗により平滑化が進んだものと考えられた。その周囲のリムに近い部分では、機械加工痕が残る症例が多く、この部分では骨頭あるいはステムとの接触がほとんどなかったものと考えられた。さらにその外側のリムの直近の部分では、機械加工痕が消失している症例があった。これは、関節の摺動の際にステムのネック部分が接触する、ネックインピンジメントによるものと考えられた。

骨頭とのはめあいがあるようになっていくと思われる症例が多くあり、UHMWPE 製ライナーの摩耗の進行が原因である可能性が考えられたが、設計上のクリアランスが不明であるため、詳細はわからなかった。摩耗の進行のため、逆にクリアランスが小さくなり、摺動時の摩擦が大きくなる症例も見られた。

デラミネーションや割れなど、UHMWPE コンポーネントの明らかな破損は見られなかった。

### (3) UHMWPE コンポーネントの FTIR による分析

FTIR の結果を表 5 に示す。各 UHMWPE コンポーネントの平均のトランスビニレン指数は、OUH002 で約 0.01、OUH005 で約 0.013 であり、その他 3 例ではほぼ 0 であった。試作した試料のトランスビニレン指数から推定されたガンマ線照射量は OUH002 と OUH005 でそれぞれ 27kGy と 36kGy であった。この値は、整形インプラントのガンマ線滅菌で一般的に使用される照射線量である 25~35kGy の範囲にほぼあり、これらの試料では滅菌のためにガンマ線照射が施されたものと推定された。その他の試料では、推定された照射線量もほぼ 0 であり、エチレンオキシドガス滅菌など、その他の方法で滅菌されたものと推定された。

各 UHMWPE コンポーネントの平均の結晶化度は 61~67% であった。ガンマ線照射を経た試料で若干高くなる傾向が見られたが、全体的に大きな差は見られなかった。

各 UHMWPE コンポーネントにおける最大酸化度は 0.65~1.67 と、比較的小さな範囲に分布していた。以前の研究の結果によると、最大酸化度が 4 を超えた場合に、デラミネーションなど材料の劣化に起因する力学的要因による不具合が発生することが報告されている。本研究においても、目視観察により明らかな破損は見られず、同様な結果であった。

### (4) 脂質による影響の検討

本研究では、異なる処理方法で段階的に脂質の除去を試みたが、各段階後の酸化度測定の結果の一例を図 14 に示す。各段階を経るごとに求められた酸化度が減少していることがわかる。ここでは図示していないが、FTIR 測定の実データを見ると、酸化度の計算に使用される領域に現れるピークのうち、脂質によるものと思われる  $1740\text{ cm}^{-1}$  付近のピークが次第に小さくなり、UHMWPE の酸化によるものと考えられるその他の  $1712\text{ cm}^{-1}$  付近と  $1716\text{ cm}^{-1}$  付近のピークの大きさはあまり変わらないことがわかった。以上の結果から、UHMWPE 内に進入した脂質により酸化度は実際よりも大きく計算されてしまう可能性があること、ヘキササンやシクロヘキササンを用いることによりその影響を小さくできること、脂質を完全に除去するためには比較的長い時間がかかることがわかった。しかし、脂質の除去に最適な溶媒の種類や温度、必要な処理時間については結論を得ることができなかったため、さらに検討を要するものと考えられた。

### (5) 臨床情報との照合および総合分析

#### 5-1 OUH001

49 歳女性、変形性股関節症 (OA) のため、バイポ



ーラ型人工骨頭置換術を施行。15.2年経過して、ステム沈下とパイポラカップの中心性移動のため、再置換となった。手術所見からは感染の所見なし。

アウターカップはセラミックス製で、破損や傷は一切観察されなかった。UHMWPE製ライナーにデラミネーションや目立つ傷、破損などは見られなかった。骨頭との摺動は良好であったが、1mm程度の遊びがあり、設計値が不明であるため結論付けられないものの、摩耗の進行の可能性が考えられた。摺動部には機械加工痕なく、光沢があった。その周辺には機械加工痕があったが、リム付近には機械加工痕が失われている部分があり、ネックインピンジの発生が推測された。この部分は全周にわたって存在しており、アウターカップの回旋が示唆された。骨頭および大腿骨コンポーネントには、抜去のためと思われる傷が観察されたが、不具合の原因になると考えられる傷や破損などは見られなかった。臨床情報より、セメントレス仕様で施行されたことが判明したが、大腿骨コンポーネントのステム部にはポーラス構造がなく、骨組織の付着も全く観察されなかった。このことから、新生骨と大腿骨コンポーネントの間に十分な結合力が得られず、大腿骨コンポーネントの沈下につながったと考えられた。

FTIR測定のプロキシレン指数から、UHMWPE製ライナーへのガンマ線照射なしと推定されたが、この結果はガス滅菌との臨床情報と一致した。最大酸化度は1.3であったが、そのほとんどが脂質によるものであり、UHMWPEの酸化劣化は進行していないと考えられた。

以上より、UHMWPEの摩耗やインピンジの可能性はあるものの、不具合の要因となった可能性は低く、その他のコンポーネントも含め破損や傷などが見られないことから、セメントレス仕様の大腿骨コンポーネントの表面設計が、不具合の第一要因として考えられた。

#### 5-2 OUH002

69歳女性、大腿骨頸部骨折のため、パイポラ型人工骨頭置換術をセメント使用施行。術後早期からセメント周囲にX線学的にRadiolucent lineを認め、ゆるみによる疼痛のため5.3年で再置換となった。感染所見なし。临床上はセメント固定の機械的ゆるみが原因と考えられた。

金属製アウターカップに破損や目立つ傷は観察されなかった。UHMWPE製ライナーにデラミネーションや目立つ傷、破損などは見られなかった。骨頭との摺動は良好であったが、遊びが2mm程度と大きめで、摩耗の進行の可能性が考えられた。摺動部は光沢があり、その周辺には機械加工痕が残る部分があった。さらにその外周部には、インピンジにより機械加工痕が失われたと思われる部分があり、OUH001と同様

の観察結果であった。

骨頭には分解時の傷以外の破損や傷は見られなかった。大腿骨コンポーネントはカラー付で、ステム部の近位部は粗面加工、遠位部はつや消し加工であったが、遠位端の一部で摩耗によると思われる鏡面化が見られた。ステム部にセメントの付着は見られなかった。

FTIR測定の結果、UHMWPE製コンポーネントはガンマ線照射による滅菌を施されていると推定された。しかし、最大酸化度は1.16とそれ程大きくなく、そのうち少なくとも半分は脂質の影響によるものと推定されたため、UHMWPEの物性が問題になった可能性は低いものと思われた。

このインプラントは、表面の粗面化でセメントの固着性を高め、カラーによりステムの沈下を防止するタイプであると思われるが、ステム近位のセメントの固着は良好で、ステム先端にはセメント界面との摩耗痕を認め、ステム沈下とともにセメント遠位に亀裂が生じ、ステムセメント間での動きが生じたものと思われた。

#### 5-3 OUH003

53歳女性、OAのため人工股関節置換術をセメントレスで施行された。ゆるみのため16.2年で再置換した。感染所見なし。

寛骨臼側のメタルシェルおよび骨頭、大腿骨コンポーネントに抜去のための傷以外の破損や傷などは観察されなかった。大腿骨コンポーネントのステム部は、段差加工がされているものの、新生骨が進入するためのポーラス構造はなく、骨組織の付着も見られなかった。

UHMWPE製ライナーのリム部分には変形や傷が多数観察された。しかし、摺動面の周りには全周にわたって機械加工痕が残っており、インピンジや脱臼によるものとは断定できなかった。摩耗が進行しており、本来の摺動面に加え、斜め奥に新たな摺動面が形成されていた。新たな摺動面は摩耗により形成されたためかクリアランスがなく、摩擦が大きく、押し付けた場合は吸引力が発生していた。

FTIR測定の結果、ガンマ線照射なしと推定された。最大酸化度は1.03で、脂質の除去により半分程度に減少した。以上の結果から、UHMWPEの材料の劣化は見られなかった。

以上の結果、OUH001と同様に、セメントレス仕様の大腿骨コンポーネントの表面設計が、不具合の第一要因として考えられた。さらに、UHMWPEコンポーネントの摩耗が懸念された。摩耗が進行した原因として、患者が若いこと、埋入期間が長いことが考えられた。摩耗の進行によりクリアランスのない新たな摺動面が形成され、大きな摩擦抵抗力や吸引力が発生する可能性がわかった。このような力の発生は



れた報告(Product Problem Flag)、及び、Adverse Eventを生じた事例(Adverse Event Flag)の情報を主題として取り上げた。

#### 【機器全体での不具合報告】

機器全体の報告数、及び implant Flag「Y」の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思われる増加によって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。2008年にグラフ上はやや減少が見受けられるが、1月21日現在では2008年の集計が完了していないためと思われ、増加傾向は続いていると推測される。implanted機器の総数は、377,964件(34.5%)であったが、implanted機器の年推移も総数と同様の傾向を示していた。

また、健康被害状況別の報告年別グラフも作成した。健康被害を生じている報告の増加傾向が著しいのが懸念される。

分野別比率においては、心臓血管系(Cardiovascular)が最も多く、次いで、一般・形成外科系(General & Plastic Surgery)、一般病院系(General Hospital)、臨床化学系(Clinical Chemistry)、消化器・泌尿器系(Gastroenterology & Urology)、整形外科系(Orthopedic)等であった。

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。一般病院系も他に比して増加傾向がみられるが、糖尿病関連の報告の増大によると思われる。

一般名別報告機器総数では、埋め込み型除細動器「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」(4.2%)の報告が最も多い。2007年までは後述する糖尿病関連の検査・治療機器が1,2位を占めていたが、報告数推移で明らかのように、ここ数年の急増を反映して、これらを抜いてしまったことになる。次いで、「Pump, Infusion」(4.0%)、「Hexokinase, Glucose」(3.4%)の糖尿病関連の治療・検査機器が続いている。この両者は、2008年の「Pump, Infusion」の報告急増と、「Hexokinase, Glucose」の報告数激減によって、総数も2007年までとは逆転している。これらを含め、「System, Test, Blood Glucose」(2.3%)、「Pump, Infusion, Insulin」(2.2%)、「Glucose Dehydrogenase, Glucose」(2.0%)とともに、糖尿病関連の検査・治療機器での報告の多さが目立つ。その次が、「Electrode, Pacemaker, Permanent」(2.9%)、腹腔鏡「Laparoscope」(2.4%)、「Coronary Drug-Eluting Stent」(2.3%)となってい

た。腹腔鏡は減少傾向にあった。

総数で前年度との変化がみられた中では、「System, X-Ray, Fluoroscopic, Image- Intensified」(1.7%)が挙げられる。最近の機器のようであるが、2007年から報告数が激増していた。

既に、部分的に述べたが、主要機器の報告数の推移を示す。増加が懸念されるのは、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」、「Electrode, Pacemaker, Permanent」、「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」などの、除細動器・ペースメーカー関連機器と、前述の「System, X-Ray, Fluoroscopic, Image- Intensified」であった。一方、「Coronary Drug-Eluting Stent」も最近の報告数が多い中で、その動向が注目される。

#### 【製品に問題があるとされた機器での不具合報告】

ここまでは、報告全体にわたっての解析であったが、徐々にその範囲を絞って解析を進めたい。不具合報告には、機器の不具合が明確でないものも含まれているが、実際に製品に問題があるとされたものについてのみ集計を行った。その数は、718,872機器で、全体の65.5%であった。報告数年推移は、同傾向であるが、Event別では、Malfunctionの割合が、全体より多くなり、Injuryが少なくなっている。

分野別では、比率も、年推移(消化器・泌尿器系で1997年にピークが見られないが)も、ほぼ全体と同傾向であった。

機器別報告数では、総数で「Pump, Infusion」が最多となっている。また、「Coronary Drug-Eluting Stent」の順位がかなり下がっていた。ステントについては、機器に問題がなくても不具合報告に挙がる例が多いと思われる。機器別推移は、総数と同傾向であった。

#### 【Adverse Eventを伴った報告】

さらに、製品に問題があるとされたものの中で、Adverse Eventを伴った報告に絞って集計を行った。その数は、96,214機器で、製品に問題があるとされたものの13.4%(全体の8.8%)であった。

報告数年推移では、同傾向であるが、ややimplantedの例が多かった。Event別では、当然のことながら、Injuryが最も多かった。Adverse Eventを生じながら、Malfunctionに留まっている報告があるのは奇異に思えるが、非常に軽度の場合なのかもしれない。

分野比率では、心臓血管系の比率が10%近くも増え、一般形成外科系は変わらないものの、整形外科系の



力学的なゆるみにつながる可能性が考えられ、今後検討を要するものと思われた。

#### 5-4 OUH004

49歳女性、関節リウマチ(RA)のため、人工足関節全置換を施行された。ゆるみのため、3.9年で再置換となった。

このインプラントは脛骨コンポーネント、UHMWPE製インサート、距骨コンポーネントからなる。UHMWPE製インサートはレール構造により脛骨コンポーネントと結合し、前後方移動と回旋が許容できるよう設計されている。入手時にこのレール部分がかみ合っており、全く動かない状態になっていたため、まず、レール部の製造不良が疑われた。しかし、3次元形状計測の結果、レール部の寸法に問題はなく、UHMWPE製インサートが後側方に向かって押しつぶされたように変形していることがわかった。

脛骨コンポーネントと距骨コンポーネントには、抜去に伴うもの以外に目立つ変形や傷は見られなかった。また、生体と相対する面にはセメントが多く付着しており、インプラントとセメントとの界面の固着性に問題はなかったものと思われた。

FTIRの結果、ガンマ線滅菌は受けていないものと推定された。最大酸化度は1.67で、今回調査した5例中、最も大きかったが、脂質の除去を行った結果、最大酸化度は0.5以下になり、酸化による材料の劣化はなかったものと考えられた。

一般的に、足関節には膝関節や股関節に比べ大きな荷重が加わるが、関節面は小さいため、高い応力が発生することが知られている。また、RAの患者では、土台となる骨がもろく、インプラント設置後にインプラントを取り巻く位置関係がずれ、インプラントに無理な力が加わる可能性が考えられる。逆に、インプラントの変形が初めに起こり、そのため周囲の生体組織に無理な力が加わり、その結果、関節の力学的な破綻に至った可能性もないわけではない。いずれにしても、材料に問題はなく、生体力学的な要因が不具合の第一要因として考えられた。

#### 5-5 OUH005

70歳女性、大腿骨頸部骨折のため、バイポーラ型人工骨頭置換術をセメント使用で施行された。術後早期からセメント周囲にX線学的にセメント破損を認め、ゆるみによる疼痛のため2年で再置換となった。

このインプラントはOUH002と同型であった。アウターヘッドに傷などは見られなかった。UHMWPE製ライナーに傷などは見られなかった。骨頭の摺動は良好であったが、クリアランスが2mm程度と大きめであった。OUH002も同程度であったこと、埋入期間が2年と比較的短期間であったことを考慮すると、このクリアランスは摩耗ではなく、仕様である可能性が

考えられた。骨頭には、分解のために生じた傷以外の異常は見られなかった。大腿骨コンポーネントには粗面加工を施してあるが、ステム全長にわたり摩耗のために光沢が出た部分が観察された。

FTIR測定の結果、ガンマ線による滅菌が施されたものと推定された。これはOUH002と同様であった。最大酸化度は0.65と小さかった。

以上の結果から、OUH002と同様に、材料の物性に問題はなく、インプラントとセメントの界面において問題が生じ、不具合に至ったものと考えられた。

## 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

### 【不具合報告のデータベース化】

不具合データは、ダウンロードした2009年1月21日現在で、不具合マスター(MDR報告:1,092,854件)、機器情報(1,101,993件)、患者情報(1,096,566件)、不具合内容(564,618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、解析を容易にするために必要なデータのみを抽出した。

MDR報告データのみからの解析では、単独機器による報告は、1,089,972件(99.7%)であり、2機器によるものは2,016件(0.18%)、3機器:510件、4機器:169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33機器をまとめて報告しているケースもあった。

単独患者の報告は1,088,936件(99.6%)で、2名によるものは1,892件(0.17%)、3名:406件、4名:85件などであった。最大で43名をまとめて報告しているケースもあった。

MDR報告データと機器情報データから、MDR Keyを連結キーとして、結合データベースを作成した。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られる。また、機器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。

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)を付加することが可能であった1,096,799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。

また、従来通り、Implantの有無(Implant Flag)の情報を参考にすると共に、製品に問題があるとき



比率が増加していた。一方で、臨床化学系の報告比率が7%も減少していた。心臓血管系や整形外科系では、他に比して Adverse Event を生じやすい傾向があると思われる。なお、臨床化学系では検査機器・診断薬の報告が多く、直接 Adverse Event に繋がらないためと考えられる。年推移では、これまでと比較して顕著な変化は見受けられなかった。

機器別総数では、除細動器、ペースメーカー関連機器が上位を独占している。また、「Pump, Infusion, Implanted, Programmable」が非常に高い順位になっていること、最近では報告が少ない「Breast, Noninflatable, Internal, Silicone Gel- Filled」が総数では上位にきていること、が特徴的といえる。糖尿病関連の検査・治療機器は、Adverse Event にまで至らない例が多いためか、総数でも推移でも殆ど姿を消している。機器別推移では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」の他に、「Pump, Infusion, Implanted, Programmable」と止血機器「Device, Hemostasis, Vascular」の急増と、ステント類「Coronary Drug-Eluting Stent」、「Stent, Coronary」の増加が目立っている。

#### 【不具合内容が明示された報告】

これらの報告の不具合内容を明らかにするために、Problem 内容のデータとリンクさせ、Problem 内容を有するデータのみを絞った。リンク可能であったのは、49,556 機器で、51.5%に不具合内容が記されていた。不具合数は88,270 件で、平均1.8 不具合/機器ということになる。

不具合総数の内訳は、示す通りで不明や埋植関連の記述を示しており、機器の不具合と直接は関係がないと思われるものである。機器の不具合内容で最も報告数が多かった、「Shock, inappropriate」に続いて、「Impedance, high」、「Capture, failure」、「Oversensing」、そして「Noise」などは、電気関係の不具合と思われる。これらに続いて、「Loose」及び「Component, worn」は、整形外科系の不具合が主体である。問題別の報告推移では、2008 年の「Loose」及び「worn」の見かけ上の減少以外は、いずれも増加傾向を示しており、特に、「Shock, inappropriate」と「Impedance, high」の急増が目立つ。なお、昨年度も同様であったが、整形外科系の集計は特に遅れる傾向があり、最終集計では増加に転ずる可能性が大きいと推測される。

分野別では、心臓血管系が圧倒的に多く、半数以上を占めている。次いで、整形外科系が多く、眼科系も一般病院系に次いで多くなっている。これらは、

埋め込み情報に関する Code 付加が他の機器に比して多くなっているためと考えられる。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。

報告数の多い機器についての機器別報告総数を示した。Implant 機器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、年推移では、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」の他に、「Pump, Infusion, Implanted, Programmable」と「Device, Hemostasis, Vascular」の急増が顕著だが、加えて「Stimulator, Spinal-Cord, Totally Implanted For Pain Relief」の急増が目立っている。これらについては、個別機器の章で詳述する。

#### 【心臓血管系の機器の不具合】

前述のように、不具合内容が明示された報告の中では、心臓血管系と整形外科系の数が最も多いため、以下では、これらの2分野について、当該分野、及び個別機器での不具合内容について解析を行うことにした。

心臓血管系機器においては、24,462 機器に、45,631 Code が記載されていた。機器別の集計で200 件以上の不具合 Code があったものを示す。

「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」と「Electrode, Pacemaker, Permanent」が双璧だが、「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」も6,000 件を超え、「Wire, Guide, Catheter」までが1,000 件以上である。年推移を見ると、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」と「Device, Hemostasis, Vascular」の急増が目立つ。

一方、不具合内容に関しては、「Shock, inappropriate」、「Capture, failure」、「Impedance, high」、「Oversensing」が、いわば4大不具合といえ、「Noise」、「Pace, failure」などと共に、電気的不具合報告が他を圧倒している。機器の破損関連では、導線破損(Lead, fracture)が他より多かった。どの不具合も増加傾向を示しているが、「Shock, inappropriate」の急増が顕著である。

#### 【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」では、「Shock, inappropriate」が、最近の増加によって最も多い不具合内容となってい



た。「Oversensing」、「Impedance, high」までが1,000件を超えていた。これら、3不具合内容の最近の報告数の増加は著しいものがある。

○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」が最多なことで、他の不具合に比して増加傾向も大きい。「Shock, inappropriate」や「Impedance, high」は比較的少なかった。もっとも、「Defibrillator, Automatic Implantable Cardioverter」に比べると本件(機器に不具合・Adverse Eventあり・不具合内容明記)に関する報告数は1/10程度である。最近の製品で使用数もまだ少ない可能性があるが、これまでの不具合を改善した製品になっているかもしれない。

○ペースメーカー電極・導線「Electrode, Pacemaker, Permanent」では、「Capture, failure」が群を抜いていた。「Impedance, high」も800件を超えており、「Damage」や「Lead fracture」などの破損を伴った事例も多かった。また、他の不具合はやや平衡状態であるが、「Damage」が増加傾向であることが懸念される。

○ペースメーカー「Pulse-Generator, Pacemaker, Implantable」では、「Pace, failure」が最も多く、「Capture, failure」、「Pacer found in back-up mode」、「Output, none」などが300件を超えていた。「Pace, failure」と「Capture, failure」の増加傾向が著しい。最近、応答不良「Interrogate, failure」も増加傾向にあり、2008年では「Capture, failure」に次いでいた。「Output, none」も増加している。

○薬物溶出型冠動脈ステント「Stent, Coronary, Drug-Eluting」では、「Occlusion」が圧倒的に多く、依然、増加傾向にある。「Stent, Coronary」でも報告はされているが、薬物溶出型では留意すべき不具合といえる。「Fracture of device/material」、「Advance, failure」、「Design/structure problem」などが100件を超えていた。特に、「Advance, failure」は「Occlusion」を越す勢いで急増中である。次に述べる「Stent, Coronary」でも、「Advance, failure」は最多の不具合の一つであり、薬物溶出型に特徴的なものとは思われない。「Design/structure problem」は、本質的な不具合ともみられるが、2004年に特定製品の4件の不具合報告に複数機器として報告されていた。回収対象にはなっていない。

○冠動脈ステント「Stent, Coronary」では、「incorrect care/use」と前述の「Advance, failure」が双璧であった。「incorrect care/use」も急増して

いるが、「Advance, failure」の急増が著しく、2008年では「incorrect care/use」の倍以上の報告がある。「Balloon rupture」は総数は100件近くあるが、2000年までの報告が殆どで、最近は何件止まりである。「Device breakage」も本件での最近の報告は殆どない。「Occlusion」は薬物溶出型に比べると少なかった。

○止血機器「Device, Hemostasis, Vascular」では、「Couple, failure」が群を抜いているが、2008年の報告が殆どである。特定社の製品で最近の事例のためか、事後対策はotherとのみ記述されていた。次に多い「Deploy, failure」や「Source, detachment」も2008年の報告が殆どである。

○「Wire, Guide, Catheter」では、「Wire, breakage」が最も多く、「Source, detachment」、「Tip breakage」が続いていた。中でも、「Source, detachment」の急増は著しく、2008年では最も多かった。本件に関しては破損例が多い機器といえる。

○周辺血管形成術用カテーテル「Catheter, Angioplasty, Peripheral, Transluminal」では、「Balloon rupture」が最も多く、「Source, detachment」がこれに続いている。「Balloon rupture」は2000年近辺で30件程度の報告が続き減少した後、最近また増加傾向にある。「Source, detachment」も2000年近辺で多かった。

#### 【整形外科系の機器の不具合】

心臓血管系機器同様に整形外科関連では、6,592機器に、12,766Codeが記載されていた。機器別の集計で140件以上の不具合Codeが付されているものを示す。また、群を抜いて報告数が多いのは、人工膝関節「Patellofemorotibial, Semi-Constrained, Cemented, Polymer /Metal/Polymer」であった。次いで、人工股関節「Hip, Semi-Constrained, Metal/Polymer, Cemented」、「Hip, Hemi-, Acetabular, Cemented, Metal」、そして、膝関節「Knee, Hemi-, Tibial, Resurfacing (Uncemented)」と続いていた。整形外科系では、人工膝・股関節の報告が9位までを占めている。また、大半の機器で2007年まで増加傾向を示している。見かけ上、2008年に減少しているが、最終的には増加すると予想される。

不具合内容としてはゆるみ「Loose」と摩耗「Component, worn」が双璧である。脱臼「Dislocated」、破損「Component, broken」、「Fracture of device/material」、「Device breakage」がこれに



続いている。年推移では、どの不具合も増加傾向にあるといえる。ここでも2008年に減少しているが、最終的には増加すると予想される。

#### 【整形外科系の不具合内容(個別機器別)】

以下、個別機器の不具合内容について記述してみる。まず、人工膝関節であるが、

○「Patellofemoral, Semi-Constrained, Cemented, Polymer/Metal/Polymer」では、摩耗が最も多く、次いで、ゆるみ、の2大不具合が殆どといえる。2007年までは、ともに増加傾向である。最近では、ゆるみ報告が摩耗を超えてきている。

○「Hemi-, Tibial, Resurfacing (Uncemented)」では、ゆるみと摩耗が双璧で、2007年までは、ともに増加傾向である。Patellofemoralタイプとは逆に、最近では、摩耗報告がゆるみを超えてきている。

○「Femorotibial, Semi-Constrained, Cemented, Metal/Polymer」では、摩耗とゆるみが双璧で、年推移では摩耗とゆるみが交互に多い報告数となっている

一方、人工股関節であるが、

○「Semi-Constrained, Metal/Polymer, Cemented」では、ゆるみが最も多く、次いで、脱臼、さらに少なくなつて摩耗という順であった。最近では、脱臼が一番多く、ゆるみや摩耗は定常状態になっている。

○「Hemi-, Acetabular, Cemented, Metal」では、摩耗が最も多く、ゆるみ、脱臼と続いていた。摩耗は2007年に急増していたが、ゆるみ、脱臼は、定常状態になっていた。

○「Semi-Constrained, Metal/Polymer, Porous Uncemented」では、ゆるみが非常に多く、次いで脱臼、「Disassembly」、摩耗となっていた。摩耗は、他の機器に比べて少なかった。最近では脱臼が増加傾向にある。

報告数は少ないが、参考までに肩関節について触れると、

○「Shoulder, Semi-Constrained, Metal/ Polymer Cemented」では、摩耗が最も多く、ゆるみ、脱臼の順であった。

骨接合材での個別機器については、

○「Screw, Bone」では、いずれも破損とみられる、「Component, broken」、「Fracture of

device/material」、「Device breakage」の3大不具合が主といえる。

○「Plate, Bone」では、「Component, broken」が最も多く、「Device failure」、「Device breakage」、「Fracture of device/material」と続いていた。

○「Fixation, Spinal Interlaminal」では、「Implant breakage or physical damage」が最多で、「Implant, repositioning」、「Malposition」、「Device breakage」と続いていた。「Device breakage」を除いては増加傾向であり、「Implant breakage or physical damage」の増加が顕著であった。

○「Rod, Intramedullary And Accessories」では、いずれも破損関連の報告が多く、「Fracture of device/material」が主であり、「Device breakage」、及び「Component, broken」が続いていた。

ちなみに、昨年度の報告で不具合報告総数が多いとして触れた、「Fastener, Nondegradable, Soft Tissue」は、本件での報告数は8件のみであった。この機器では、殆どが、機器の不具合によるAdverse Eventには繋がっていないことになる。

#### 【その他の機器の不具合(個別機器別)】

機器に不具合があり、Adverse Eventが生じている機器で、不具合内容が記述されている機器の内、心臓血管系、及び整形外科系以外の機器で、最近、報告が急増している2機器について、触れておきたい。

○「Pump, Infusion, Implanted, Programmable」では、「Motor drive unit stalled or jammed」と「Volume accuracy」が最も多かった。次いで、「Tears, rips, holes in device」が250件近くであり、「Repair」、「Occlusion」、「Underinfusion」、「Kink」などが、150~200件の範囲にあった。いずれも増加傾向だが、2008年での報告数が顕著な機器は、「Volume accuracy」、「Repair」、「Motor drive unit stalled or jammed」、「Occlusion」であった。

○「Stimulator, Spinal-Cord, Totally Implanted For Pain Relief」では、「Impedance, high」、「Shock, inappropriate」の電气的不具合が双璧で、「Implant, reprogramming」、「Migration」、「Implant, repositioning」と続いていた。電气的不具合以外では、埋め込み位置設定の不具合が多いように感ずる。最近の機器のようであり、2008年の報告が殆どであった。

なお、最近の総報告数の急増が顕著だった、



「System, X-Ray, Fluoroscopic, Image-Intensified」は、機器に不具合があり、Adverse Eventが生じている機器としては、62件(170位近辺)の報告に留まっていた。

#### 【薬事・食品衛生審議会への不具合報告】

薬事・食品衛生審議会への報告の総計は63,429件であった。2回目の報告以降には健康被害状況が記載されているため、健康被害がないものを別途集計したが、初回分を除き、健康被害なしは73%であった。部会の開催日はやや不定期な時もあったため、1日当たりに換算した報告数の推移を示す。報告の大半を占めている「手動式医薬品注入器」、及び「注射針」を別集計したものも含めている。報告数全体の推移傾向は、「注入器+注射針」の報告数にかなり負うところが大きい。その他の機器による報告数では最近では定常状態にあるといえる。幸い、「注入器」と「注射針」の報告は減ってきている。

不具合報告の一般的名称には、新旧の名称が混在しているため、分類が複雑で統一して集計することが困難である。旧分類を採用した根拠は以前の報告に詳述したが、今年度も旧分類に基づいて機器分類を行った。

機器全体の機器分類別集計結果を示す。報告数が顕著な機器は、前述の手動式医薬品注入器、及びその注射針である。これが全報告の71%を占めている。次いで、眼内レンズ、中空糸型透析器、植込型心臓ペースメーカーの導線、滅菌済み血管処置用チューブ及びカテーテル、人工股関節、酸素濃縮式供給装置と続いている。

機器全体の機器分類別報告数推移(1日当たりの報告数の推移)を示す。眼内レンズは定常的に年間300件を優に超している、漸増傾向にある。透析器は初回の報告数が大きい。年間200件程度の定常的な報告があり、やや減少傾向である。植込型心臓ペースメーカーの導線では、最近では年間300件近くの報告がある。滅菌済み血管処置用チューブ及びカテーテルでは、定常的に報告が多い。

酸素濃縮式供給装置やコンタクトレンズなどの集中報告での突出したピークが目立つ他は、眼内レンズ、植込型心臓ペースメーカーの導線、滅菌済み血管処置用チューブ及びカテーテル、人工股関節、ステ

ント、骨接合用品、などで報告数の増加傾向が見られる。市販数が増加しているとはいえ、今後の動きが気になるところではある。

#### 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

(1)埋め込み手術後の体重変化及び実験終了後の脳の肉眼解剖所見、膜の吸収

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群 517.9 ± 16.6 g、モデル品PLGC膜埋め込み群518.5 ± 9.4 g、高濃度OT含有膜埋め込み群 513.3 ± 11.0 g、高濃度DBT含有膜埋め込み群514.9 ± 11.6 gであった。

回収した膜から計算した膜の吸収重量の平均値±標準誤差は、モデル品PLGC膜6.28 ± 0.56 mg、高濃度OT含有PLGC膜は 9.75 ± 0.86 mg、高濃度DBT含有PLGC膜は5.94 ± 0.39mg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、大脳皮質の損傷が深く海馬に及んでいる個体もあった。壊死や損傷が海馬に及んでいるものを損傷が著しい個体と判断した。

脳表面の損傷が著しいcontrol群1匹、モデル品PLGC膜埋め込み群3匹、高濃度OT含有PLGC膜埋め込み群3匹、高濃度DBT含有PLGC膜埋め込み群2匹は行動学試験の解析から除いた。その結果、control 10匹、モデル品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8匹の解析となった。

#### (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)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。

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)PPI test

PPI test について示した。%PPI at P80 についてのみANOVAでP=0.059となったが群間で有意性を示すには至らなかった。

#### 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



屈曲角度 35° 及び 80° における動作状態と脛骨インサートのミーゼス相当応力分布図を示す。動作状態より、屈曲にともなって側副靭帯が大きく変形していることが確認できる。応力分布図をみると、35° では前方顆部関節面にのみ若干の応力集中が生じていることが確認できる。一方、80° では、後方顆部関節面での応力集中に加えて、Post 表面にもより高い応力集中が生じている。

顆部関節面と Post 表面の屈曲にともなう最大相当応力値の変動を示す。変動の推移をみると、顆部関節面では屈曲角度が大きくなるにつれて最大応力値も増加するが、50° 付近でピークを迎えた後は減少していく傾向にある。一方、Post 表面では Post と大腿骨コンポーネントの Cam が接触し始める 40° 付近から急激に増加し、80d° まで急激に増加し続けることが確認できる。これらの結果から、屈曲動作が繰り返されることで応力集中も繰り返し生じ、その結果、脛骨インサートの摩耗や Post 部分の破損を生じる危険性が高まることが示唆される。また、TKA 後に屈曲角度が制限されることがあるが、このことは屈曲角度が増加するにつれて力学的抵抗が増大することと関係があると考えられる。

## 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

### (1) 血流と数値流体解析の整合性

血流の速さを超音波診断装置で測定した結果、CCA は 0.677m/s、ICA は 0.407m/s、ECA は 0.607m/s となった。

この結果を再現するには、Case2 のような圧力差を必要とした。結果比較のために、血流の可視化をおこなった。その結果より、血流分布は 3 つの case 間ではマクロ的には似ているものの、詳細に観察すると違っていることが分かった。特に case1 においては、ECA と ICA の血流分配(血管断面部においての中央付近の速さ)は、超音波の結果とも case2、3 と異なっており、非常に頻繁に使用されている case1 のパラメータ設定は実際の血流分布とは違うものを計算結果として示す可能性がある。

### (2) ステントストラットが血流に与える影響について

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。

ステントストラットを動脈瘤ネックの上流部分のみ留置した場合、動脈瘤ネック全面にステントストラット留置するより壁ずり応力および瘤内の流速速度の低下が見られ、最大壁ずり応力で約 30%、最大流速で約 20%の低下であった。動脈瘤ネックの下流端にステントストラットを留置した場合、ステントを留

置しないケースより壁ずり応力の向上が見られ、最大壁ずり応力で約 6%の向上であった。

最大壁ずり応力ではステントストラットの配置によって約 5 倍程度の相違が生じているが、最大流速では約 2 倍の相違となっている。動脈瘤内での血流パターンの相違に関しては、ステントを留置の有無に依らず動脈瘤内では大きな旋回流が発生し、定性的に大きな相違が見られなかった。

壁ずり応力と最大流速との比較をすると、ステントストラットの配置の違いによって、最大壁ずり応力では約 5 倍の差であるのに対し、最大流速では約 2 倍程度と差であった。このことは、壁ずり応力と流速の差が一致していないことを意味する。この原因として、ステントストラットの配置によって動脈瘤ネックにおける血流の向きが変えられたことが考えられる。脳動脈瘤ネック付近の血流を速度ベクトル図により可視化した。壁ずり応力が高い傾向を示したものでは流速が速いだけでなく、動脈瘤壁近くに流入する流れが形成され、その流速も他と比較しても高いことがわかる。

ステントストラットの配置が動脈瘤ネックでの血流の向きを変えたと考えられる。このネック付近での血流の向きが動脈瘤内の壁ずり応力値に影響を与えていると考えられる。

## 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

#### (1) 人工股関節の形状モデル作成

図 15 に、測定対象とした人工股関節の写真と、VIVID 9i で測定した形状データを RapidForm で結合した後の表面形状ポリゴンデータを示す。

#### (2) 血管内ステントの形状モデル作成について

マイクロフォーカス X 線 CT での測定に先立って、走査型電子顕微鏡 JSM-5800 (日本電子株式会社) で CYPHER ステントを観察した際の観察像を図 16 に示す。ストラット寸法が 100 μm ~ 200 μm 程度しかなく、VIVID 9i の精度では正確な測定が難しいことがわかる。

図 17 は、マイクロフォーカス X 線 CT で多数のスライス画像を撮り、その画像を元に表面座標を抽出して 3 次元形状としたものを示している。この測定では、マイクロフォーカス X 線 CT においても、本来連結しているはずの箇所断裂が存在する等の問題が見られ、十分に正確な形状が得られなかった。

#### (3) 歯科用骨固定材の形状モデル作成および力学シミュレーション

##### 3-1 形状モデル作成

今回対象とした骨固定プレート製品 (Stryker 社、56-28087) の写真と構築した形状モデルを図 18 に示



す。VIVID 9i によって表面位置が測定できた外形部分については、ほとんどの箇所が VIVID 9i の測定精度程度の精度で自由曲面による形状の再現ができた。一方、VIVID 9i は測定光の影になる部分は測定ができないため、スクリューを通す孔の内側等は位置データが得られなかった。このような部分は測定できた外形データを基に形状を補った。

### 3-2 医師による塑性変形を想定した力学シミュレーション

歯科用骨固定材の部分モデルを 10 kg~60 kg の荷重で曲げた際 (図 19) の相当塑性ひずみ分布を図 20 に示す。この図における変形表示は、荷重を負荷したままの状態を示している。また、図 21 は、拘束部 (部分モデルの左端部) 付近の上半部に生じた最大相当塑性ひずみの推移である。これらの図より、30 kg 程度の荷重までは塑性ひずみは限定的であるが、その後荷重が大きくなるにつれて塑性変形が大きくなっている様子がわかる。

除荷後の残留応力 (ミーゼス相当応力) 分布を図 22 に示す。図 22 の変形表示は、除荷後の変位を示している。残留応力は、30 kg~40 kg 負荷程度の比較的小さい段階ですでに 700~800 MPa 程度の大きさで分布し始め、塑性変形が大きくなるに従って残留応力が存在する範囲が広がる結果となった。特に空孔部周辺に比較的大きな残留応力が生じた。

## 1 1. 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

### (1) 不具合報告のまとめ

カテーテル・チューブの不具合の発生のまとめを F 示す。不具合は 1031 件報告されており、うちバルーン 205 件、チューブ 134 件、先端チップ 126 件、ガイドワイヤー 117 件、その他 285 件、不明 164 件であった。

また、ガイドワイヤーの不具合事象を示す。不具合事象は 84 件報告されている。うち断裂 29 件、離断 28 件、破断 5 件、コーディング際の剥離 8 件、抜去困難 2 件、不明 (血管穿孔) 7 件、破損 2 件、内芯露出・異物付着 2 件、不明 1 件であった。また、患者に対する有害事象の内訳については、体内残存が 51 件、血管穿孔が 10 件、また症状なしが 23 件であった。

このうち、体内残存については、内科的治療を中止し、外科的に残存物を取り除く対処法がとられていた。一方で、血管穿孔については、有害事象が発生する前に防ぐ方法を認識することが重要と考える。そこで、臨床時の状況を模擬し、絵館先行を未然に防ぐためのリスクアセスメントを行う。

### (2) ダイレータ・ガイドワイヤーによる血管穿孔可能性を調査する新試験法の開発

### 2-1 医師によるガイドワイヤーの挿入力

対象を頸静脈であると想定したときの挿入力を医師 4 名 (2 年目 1 名, 5 年目 1 名, 12 年目 2 名) が再現した結果を示す。これより、経験年数によって、挿入力に差があるとはいえず、平均で 6.6N、標準偏差が 8.6N であった。

### 2-2 採用データとその定義

一般的に血管の穿孔点は、組織をダイレータの先端が貫通することにより力が急激に落ち込む点で示される。ダイレータ先端による血管穿孔でない場合でも、血管に穴が開く場合があった。このときの血管の穴は、血管が破れるというのではなく、繊維がダイレータによって伸展されることにより、壁が薄くなっていくという穿孔であった。

静脈壁は、内皮細胞と内皮下層から構成されている内膜、及び平滑筋細胞の層である中膜は著しく薄い。静脈壁の大部分を占める外膜は中膜より厚く、縦走する膠原線維束と弾性線維網が配している。そこで明確な血管穿孔点がない場合については、上記のような静脈壁の構造から、示した曲線で、高荷重領域の変曲点をダイレータが外膜組織を破壊しながら変形を開始する塑性域での変化点とみなし、穿孔荷重を代表する値として算出した。

低荷重領域の変曲点はダイレータ及びガイドワイヤーが内膜、中膜の変形を開始させる弾性域内での変化点とみなし、手技上血管壁に影響を及ぼさないと判断されるため採用しなかった。このような場合の穿孔荷重は Not Available (NA) とした。

### 2.3 頸静脈穿孔荷重試験

$\theta = 60^\circ$  でダイレータ先端が血管を突き破ったときを除いて、他の場合は、ダイレータ先端が試験片の末端にくる直前まで計測した結果である。

・  $\theta = 15^\circ$  では、ダイレータは血管壁をすべるのみであり、荷重は最大で 1.2N であった。

・  $\theta = 30^\circ$  では、ダイレータが血管壁をすべった後、試験片との角度に合わせて変形したが、穿孔はなかった。

・  $\theta = 45^\circ$  では、ダイレータの腹の押し込みにより、試験片が菲薄化することによる穿孔が起こった。

・  $\theta = 60^\circ$  では、ダイレータ先端が血管を突き破ることによる穿孔が起こった。

・  $\theta = 37.5^\circ$  では、ダイレータが血管の上をすべるのみで、血管穿孔に至らない境界であった。

### 2.4 挿入角度と荷重の関係

試験を実施し、データの取得可能であった試験片を対象にした結果を示す。角度  $30^\circ$  のときに、計測結果が最大 12N を超えたとしても、血管穿孔は確認されなかった。また、 $30^\circ$  から  $45^\circ$  の中間点の場合



も、45N 近くになっても血管穿孔は発生しなかった。45° では荷重が約 11N で血管の穿孔が認められた。60° では 30N で血管穿孔が発生したが、45° のときと同様に約 14N を超えるとダイレータ自身による血管への押し込みが起こった。

## 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

### (1) マウスの体重の変化

マウス自身の体重は、処理前後で六日間飼育する間に成長した分の増加はみられるが、特に陰性対照群（媒体対照群）、試験物質群、陽性対照群の間で大きな差はなかった。

### (2) リンパ球の増殖能（BrdU の取込み）

BrdU ELISA を使って、LN s の増殖を測定した。ここでは示していないが、陽性対照として DNCB の濃度を決定するため、0.5%と1%の DNCB で検討したところ、両方でリンパ球の細胞増殖の程度に差はなかった。従って、我々は 0.5% DNCB を陽性対照として選択した。次にポリマーのみでの試行では反応が弱かったので、陽性反応がでない程度の DNCB を一緒に塗布する方向で実験を行うことにした。そのため陽性反応が出ない DNCB の濃度の検討を行った。その結果、0.001%、0.01%、0.1% の三者はいずれも陽性反応を示さなかった。0.001%DNCB は作製時の誤差が大きくなるので、0.01%が適当であると判断し以下の実験に適応した。今回おこなった In vivo LLNA-BrdU 法の場合、陰性対照群に対する試験物質投与群の平均吸光度比を Stimulation index (SI) で表し、 $SI \geq 3$  を感差性陽性と判断する。

今回の実験では、ポリマー単独では唯一、5%P3 のみが陽性であった。一方、P1, P2, P5 の単独では  $SI \geq 3$  を超えることはできなかったが、0.01%の DNCB と共に塗布した P1, P3, P5 では  $SI \geq 3$  を超えた。しかし、P2 の場合には、0.01% DNCB と共に塗布した場合でも昨年度の in vitro の実験 (h-CLAT) と同じに陰性であった。

### (3) サイトカインの測定

陰性対照、陽性対照およびポリマーP3 で処理したマウスのリンパ球の培養上清中には Th2 型のサイトカイン (IL-5, IL-4) の発現はほとんど見られなかった。一方、Th1 型サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) は陽性対照で高い発現がみられた。ポリマーP3 では陰性対照と同程度の発現しかみられなかった。唯一、5%ポリマーP3 + 0.01%DNCB で IL-2 の発現上昇が見られているが (n=3)、さらに再現性の検討が必要と思われる。

面白いことに、0.01% DNCB と 0.5% DNCB では、IFN- $\gamma$  は濃度依存的に発現量が増えているのに対して、TNF- $\alpha$  および IL-2 は逆相関が見られた。

## 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

メチル基用試薬に対して他の官能基用試薬をモル比で 0、20、40、50、60、80、100%となるように混合したエタノール溶液を調製し、その溶液中に基材を 24 時間浸漬させることで種々の組成で 2 種類の官能基をもつ表面を得た。これらの表面上の適当な 5 点から接触角を測定した結果を示す。水酸基用、あるいはカルボキシル基用試薬を用いた場合には、それらの混合比率が高くなるに従って、接触角が低下していくことが認められた。ただし、水酸基用試薬を用いた場合には逆シグモイド曲線様に接触角が低下していくのに対し、カルボキシル基用試薬の場合には、角度が直線的に低下した後にカルボキシル基が 80%程度で一定値になることが認められた。また、アミノ基用、あるいはリン酸基用試薬を用いた場合には、その接触角は混合比率 20%、40%に増加するまでは直線的に低下し、その後は混合比率の増加に関わらず一定値を示すことが認められた。なお、未反応の基材表面の接触角は 81.9° であった。また、水酸基、あるいはカルボキシル基を導入した表面に関して、ESCA による表面分析を行ったところ、浸漬した溶液中の各試薬濃度が高くなるに従って酸素に起因したシグナルが強くなっていくことが認められた。

これらのモデル表面のうち、まず、接触角の変化が細胞挙動に与える影響を検討する目的で、最も接触角変化に幅のあったメチル基と水酸基とから構成される表面上に NH0st を培養して、その増殖と分化指標となる ALP 活性変化を測定した。その結果、培養 1 日目の細胞数に着目すると、骨分化誘導因子を含まない培地を用いた場合には、表面上の水酸基量に関わらず水酸基を含む表面上の細胞数はほぼ一定であった。それに対して、骨分化誘導因子を添加した培地を用いた場合には、水酸基量が 60%程度で細胞数は極大を示した。培養時間が長くなるに従って、表面上の細胞数は水酸基量に関わらず、また骨分化誘導因子の有無に関わらず、飽和することが認められた。ただし、メチル基単独表面上の細胞数は培養時間に関わらず少ないことが示された。また、その吸光度変化から、細胞増殖が阻害されている可能性があることが示唆された。

これら表面上で培養した NH0st の ALP 活性は、培養時間に関わらず、また水酸基量に関わらず有意な差は認められなかった。当然のことながら、骨分化誘導因子を添加した培地中の NH0st は、未添加のものと比較して常に高い ALP 活性を示したが、培養が長くなるにつれてその差は大きくなることが認められた。なお、メチル基単独表面上で 1 週間培養後の ALP 活性のみ、他の表面と比較して明らかに抑制されていることが認められた。

これらモデル表面上での検討とは別に、炎症系モ



デル細胞の探索を行ったが、現時点では適当な細胞、培養条件、及び評価のための指標は判明しなかった。

## 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、スルホン化プレートに吸着する蛋白質を同定し、NH0st の分化進行に関与すると思われる機能性蛋白質を検索した。スルホン化プレート吸収血清を使用した NH0st の培養実験の結果から、NH0st の増殖能及び分化進行に大きく関与する蛋白質群がスルホン化プレートに吸着されることが明らかになった。また、二次元電気泳動解析において、スルホン化プレート吸着蛋白質はオリジナルの血清蛋白質と明らかに異なる泳動像を示した。現時点では非特異的吸着を否定することはできないが、スルホン化プレートは直接又は蛋白・蛋白相互作用を介して特定の蛋白質群を吸着する機能を持つことが示唆された。

IGF や TGF- $\beta$  などの成長因子は NH0st の増殖と分化に深く関与していることが報告されており、スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析において、IGF 関連蛋白質である IGF2 と IGF1R、TGF- $\beta$  関連蛋白質である TGFBR3 が検出されたことは興味ある知見である。昨年度に実施した遺伝子発現解析において、スルホン化プレート上で NH0st を培養した時、これら 3 種の蛋白質をコードする遺伝子群の発現は早期に誘導されることも明らかになっていることから、各種の成長因子の中でも IGF 群と TGF- $\beta$  群が NH0st に対するスルホン化プレートの機能発現に大きく影響していることが示唆された。

骨代謝には様々な蛋白質が関与している。MIME はオステオカルシンと同様に NH0st のアパタイト形成に深く関与する蛋白質である。TETN は NH0st の分化初期に重要な役割を果たしている蛋白質であり、PLMN と親和性を持つことが報告されている。Thiol protease inhibitor としてシステインファミリーに分類される SPP24 は非コラーゲン性の骨蛋白質であり、骨代謝の調節機能を持つことが知られている。また、VTDB は骨成長や骨リモデリングに関与する蛋白質である。

スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析では、上記の成長因子関連蛋白質、骨代謝関連蛋白質及び細胞外マトリクス関連蛋白質のほか、抗アポトーシス作用を示すことが知られている PEDF が検出された。昨年度に実施した遺伝子発現解析においても、培養初期において 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、スルホン化プレート上で培養した NH0st はアポトーシスが抑制されていることが示唆された。

近年、細胞外マトリクスが細胞の増殖と分化に大きな影響を及ぼしており、コラーゲンは増殖促進、フィブロネクチンは分化進行に関与していることなどが明らかになってきた。スルホン化プレート吸着蛋白質のショッ

トガン解析においても C01A1、C01A2、FN1 が検出されているが、その他、軟骨系細胞外マトリクスである COMP と HABP2 が同定されたことは非常に興味深い知見である。

スルホン化プレートは NH0st の分化進行を顕著に促進する機能を持つが、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。現在までに、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と共に、本研究においても、スルホン化プレートには NH0st の分化進行に深く関与すると思われる種々の蛋白質が吸着することが明らかになった。これらの知見から、スルホン化プレートが持つ NH0st の分化促進機能はバイオインターフェースに介在する蛋白質により制御されていることが容易に推察できる。今後、本研究において同定された興味ある蛋白質をサプリメントとして添加したスルホン化プレート吸収血清を用いて NH0st の培養実験（レスキュー実験）を行うことにより、同細胞の分化進行を制御する主要な蛋白質を同定することを試みる。また、分子モデリングツールを利用して、スルホン基/蛋白質間相互作用の有無についても検討する予定である。平成 20 年度の本研究では、材料側に吸着する蛋白質の解析を行ったが、次年度はスルホン化プレート上で培養した NH0st の蛋白質発現解析を行い、細胞側の性状変化を追跡する予定である。

### 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

細胞毒性試験において、0.1 および 0.2  $\mu\text{m}$  の PS 粒子はほとんど毒性を示さなかった。これらの分散液は理想的な分散状態を示し、処理終了時にも沈殿はほとんど認められなかった。すなわち、接着細胞にほとんど接していないことが原因である可能性が高い。ナノマテリアルの安全性評価では、どうすれば材料凝集体の分散をよくして細胞に処理できるかを検討しているところであるが、理想的なナノレベルの分散液を調製できた時、同様のことが起きる可能性もあり、注意を要する。

サイズの異なる粒子の生物反応を比較するとき、同じ重量濃度で比較すべきか、同じ粒子数で比較すべきか、あるいは同じ表面積量で比較すべきか、迷うところである。本研究では、一貫して重量濃度で実験データを記載しているが、例えば、図 11 で示した 4.45 と 5.26  $\mu\text{m}$  の比較を同じ粒子数で行うとすれば、4.45  $\mu\text{m}$  粒子の 200  $\cdot\text{g/ml}$  での粒子数は、5.26  $\mu\text{m}$  粒子では 328  $\cdot\text{g/ml}$  での粒子数と同じである。図 10 には、5.26  $\mu\text{m}$  PS 粒子の 328  $\cdot\text{g/ml}$  での処理細胞の写真は示されていないが、500  $\cdot\text{g/ml}$  よりも明らかに少ないことを確認しており、同じ重量濃度で比較しても、同じ粒子数で比較しても 5.26  $\mu\text{m}$