

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5 kg～60 kg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。

C. 研究結果および考察

1. 人工股関節の形状モデル作成および力学シミュレーション

図1は、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している。このように、三次元形状測定装置によって、人工股関節の実

物から形状再現性のよい形状データを作成することができた。形状測定の際、人工股関節表面に微細な粒子を塗布したが、これは測定結果にはほとんど影響を与えないと考えている。VIVID 9iの測定精度は50 μmであるのに対して、塗布した粒子の粒子径が20 μm程度と小さいためである。

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2に示す。ストラット寸法が100 μm程度であり、VIVID 9iでは測定が難しいことがわかる。

図3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、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。そのため、今後、マイクロフォーカスX線CTの測定条件修正や、別の測定装置を用いた形状測定、あるいはSEM等での観察を基にしたスケッチでCADデータを作成するなどの手段で形状データを構築したいと考えている。

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4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、ほとんどの箇所で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手動で形状を補った。

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 の荷重で曲げた際の相当塑性ひずみ分布を図 6 に示す。この図における変形表示は、荷重がかかったままの状態を表している。また、図 7 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 8 に示す。図 8 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 負荷程度の比較的変形が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。この残留応力は、骨固

定材の疲労強度や応力腐食に影響を及ぼすことが予想される。

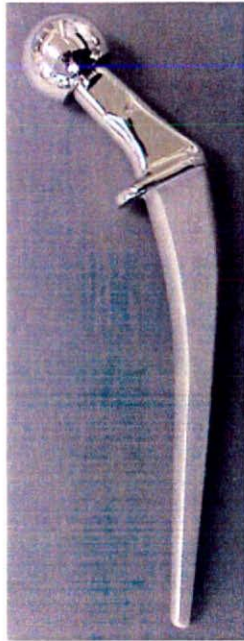
D. 結論

光学式三次元形状測定装置とリバースモデリングソフトウェアを使用することで、人工股関節と骨固定材の製品から形状モデルを作成した。特に歯科用骨固定材においては、作成した形状モデルを用いて弾塑性有限要素解析を行った。その結果、変形操作によって、骨固定材がどのような相当塑性ひずみを受けているか、残留応力はどの程度存在するかを見積もることができた。

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 石川 格：コンピュータシミュレーションによる歯科用骨固定材のリスクアセスメント。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」成果発表会（2009年1月，東京）



4-U 人工股関節
(ナカシマメディカル株式会社)



計測による形状モデル

図 1 形状測定の対象とした人工股関節と計測データに基づく形状モデル.

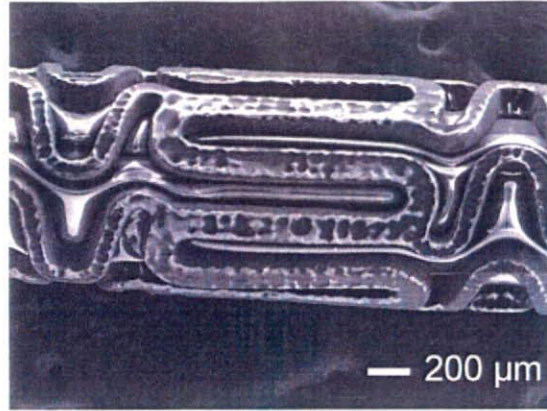
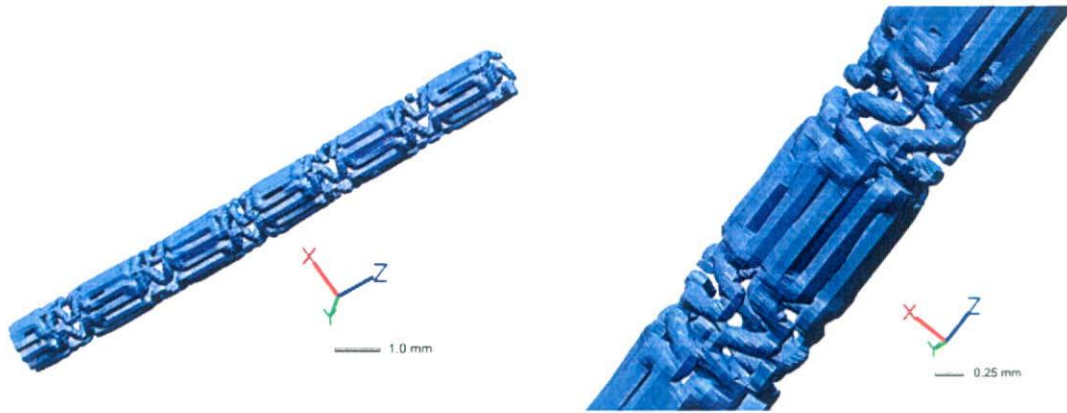


図 2 血管内ステント (CYPHER ステント).



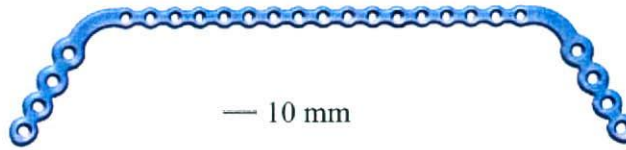
全体図

拡大図

図 3 マイクロフォーカス X 線 CT による血管内ステントの形状測定結果.



(a) 歯科用骨固定材 (Stryker 社, 56-28087).



(b) 三次元形状測定により作成した形状モデル

図 4 今回測定対象とした歯科用骨固定材と作成した形状モデル.

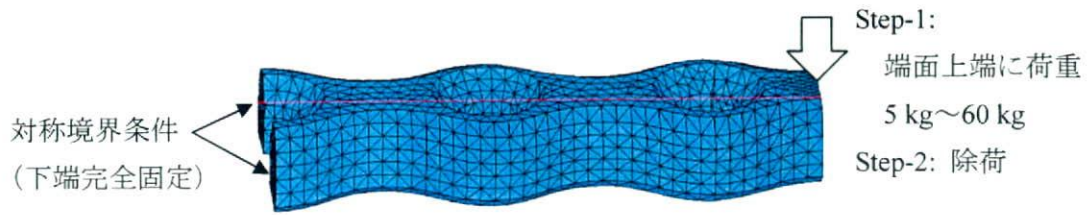


図 5 境界条件

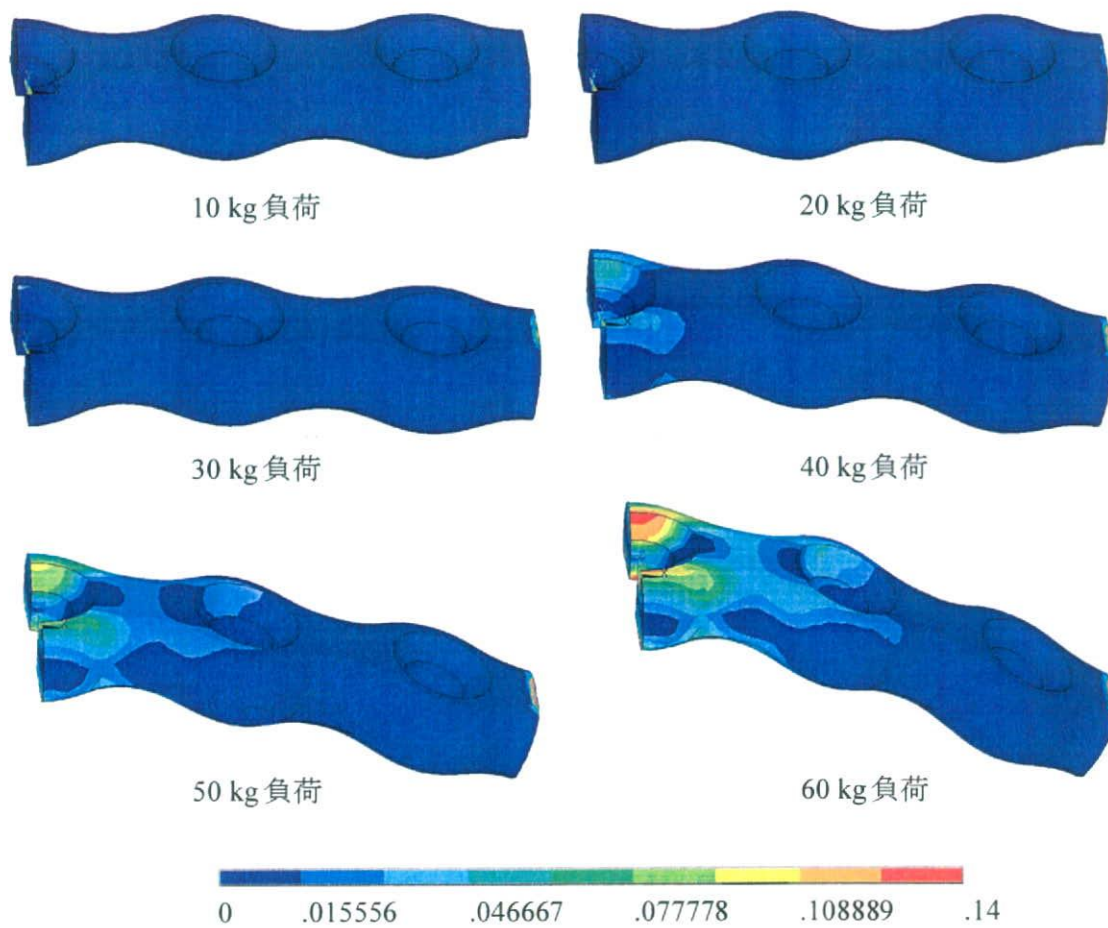


図 6 相当塑性ひずみ分布.

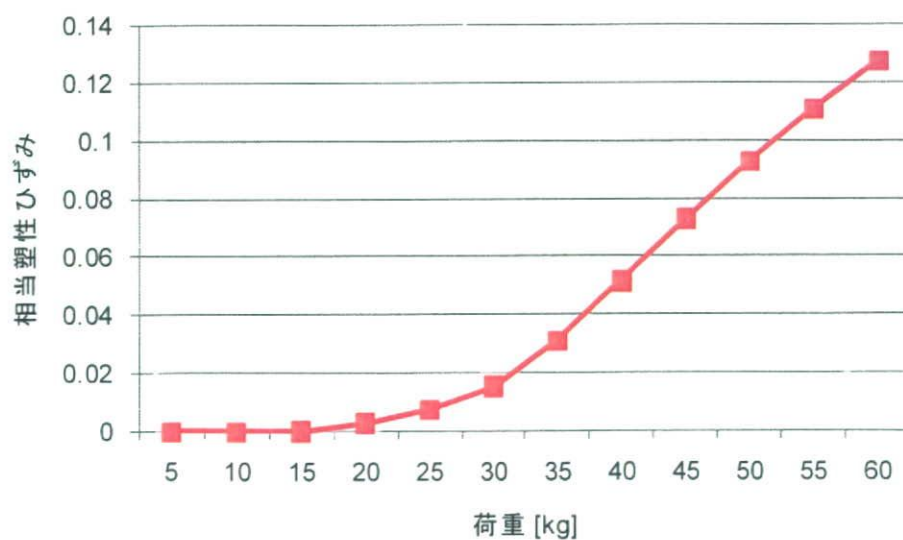


図 7 最大相当塑性ひずみの推移

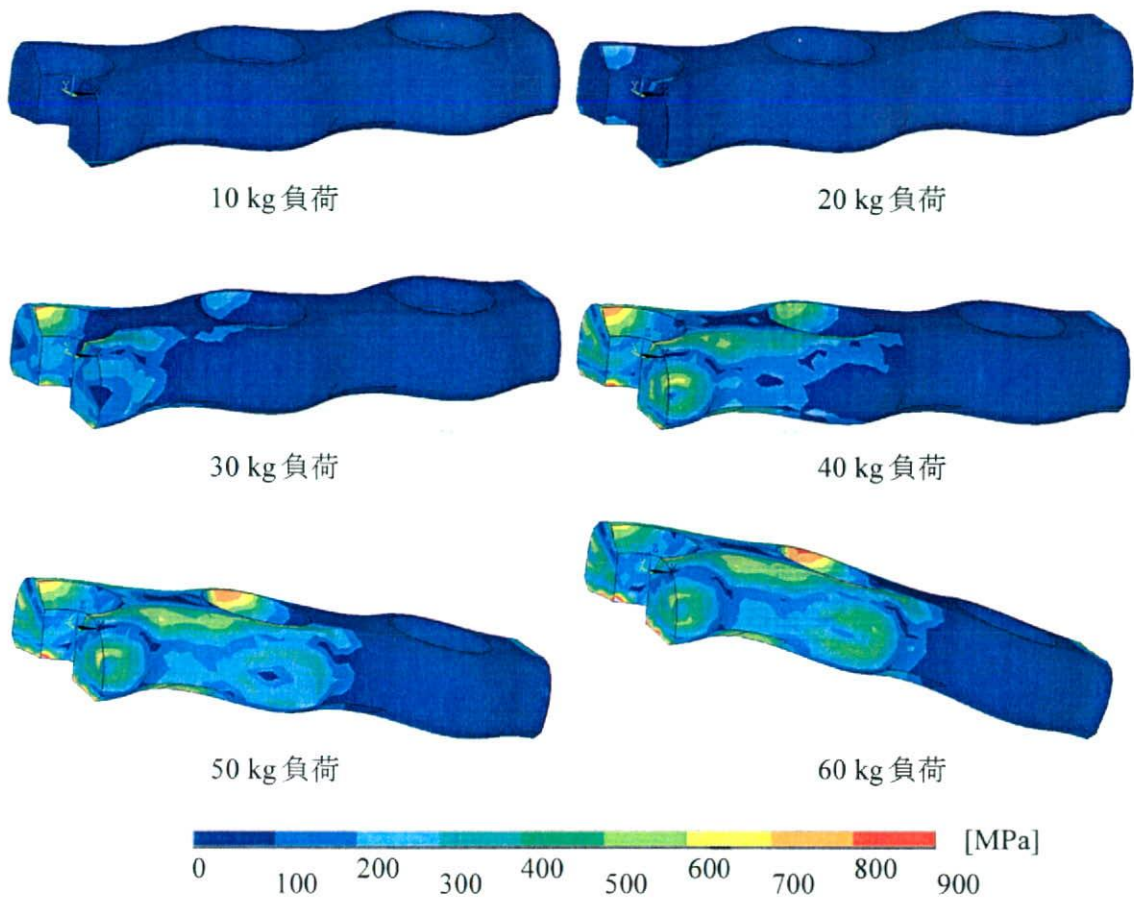


図 8 残留応力（ミーゼス相当応力）分布. 変位は除荷後の状態を表示している.

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

植松 美幸

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 植松美幸 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨

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名の医師のダイレー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、ブタ頸静脈に対してダイレータおよびガイドワイヤーを挿入する状況を再現した。ダイレー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、ダイレータ及びガイドワイヤーの状態を観察した。

医師のダイレータ挿入力は平均で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、ダイレータ挿入角度が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、ダイレー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、ダイレー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、ダイレー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。

A. 背景・目的

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。

B. 研究方法

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。

Fig.1 にダイレータ挿入力計測の様子を示す。

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

Fig.2 に示すように引張試験機 (AGI-250kN,

被験者：医師 7名
(経験年数：2, 3, 5, 10, 12, 15 年)

フォースゲージのアダプターに
ダイレータを差し込み
臨床と同じぐらいの力で押す



Fig.1 ダイレータ挿入力計測の様子

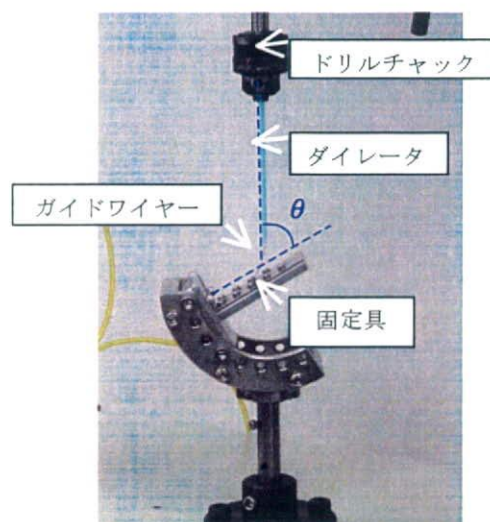


Fig.2 試験機の設定

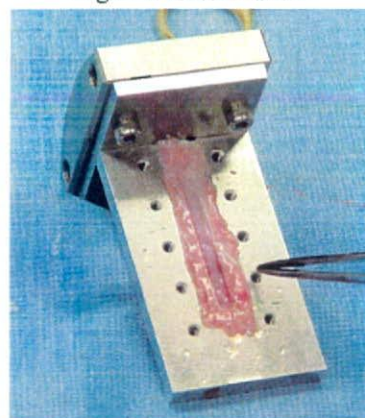


Fig.3 内皮を露出させたブタ頸静脈

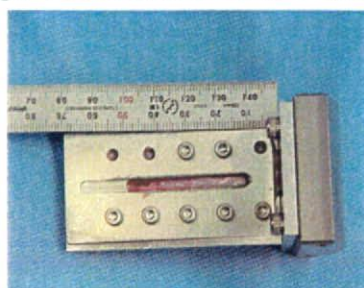


Fig.4 ブタ頸静脈の固定

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

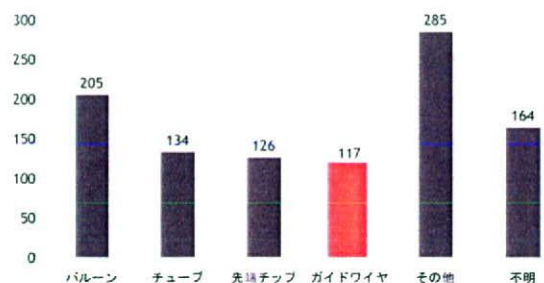
対象を頸静脈であると想定したときの挿入力を医師 4 名 (2 年目 1 名, 5 年目 1 名, 12 年目 2 名) が再現した結果を Fig.7 に示す. これより, 経験年数によって, 挿入力に差があるとはいえず, 平均で 6.6N, 標準偏差が 8.6N であった.

2.2 採用データとその定義

一般的に血管の穿孔点は, Fig.8 における④の点が表すように, 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, Fig.8 に示した曲線で, 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



厚生労働省「医療機器不具合等報告について」をもとに算出

Fig.5 カテーテル・チューブの不具合状況 (2004 年 7 月～2007 年 7 月:全 1031 件)

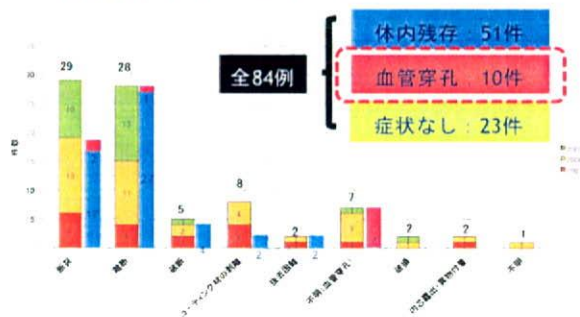


Fig.6 ガイドワイヤーの不具合報告の内訳 (2005 年 4 月～2007 年 9 月:全 84 例)

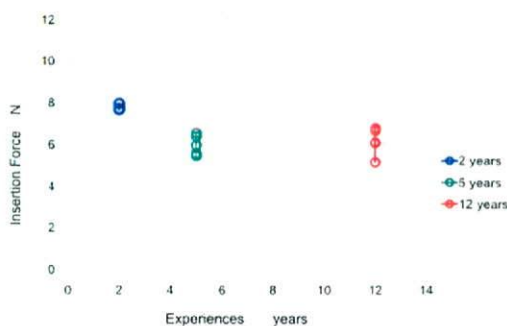


Fig.7 対象血管に応じた挿入力

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.

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 θ 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。ブタ頸静脈は走行方向に約40mmの長さにとり、周方向について脂肪組織を取り除いた。Fig.3に示すように切開して内皮を露出させた状態で治具に装着し、Fig.4に示すように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 θ とした際、 θ に対する穿孔時荷重を計測する。

- (1) ブ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 θ が 15° 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 θ を 30° 、 45° 、 60° 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 ϕ 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 ϕ 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 θ 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 ϕ をさらに 5° 減じた角度とし、(3)~(5)を繰り返す。

C. 結果

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Fig.5に示す。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Fig.6に示す。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

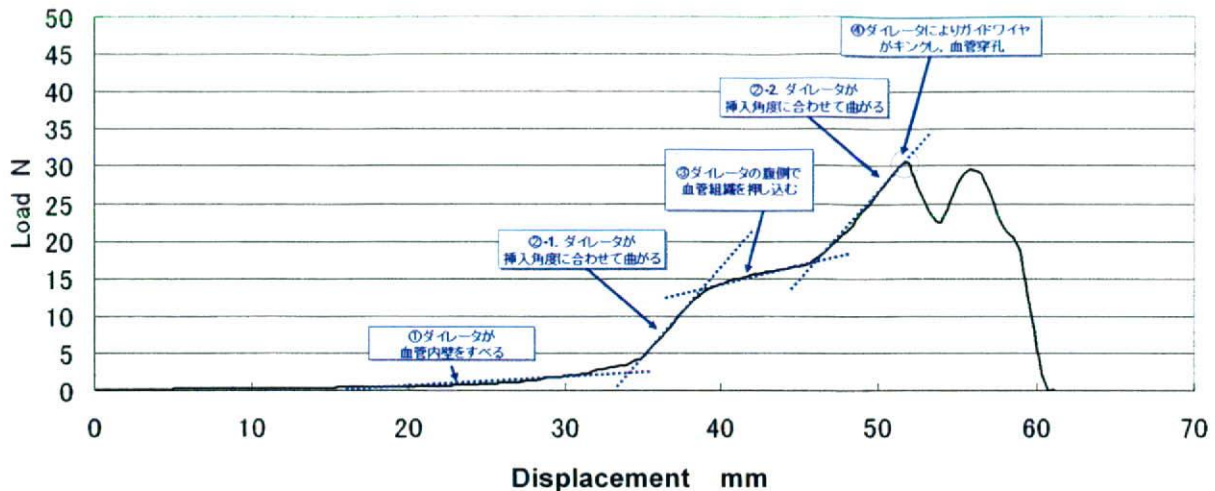


Fig.8 高荷重領域に血管穿孔が起こるときの押し込み距離と荷重の関係 ($\theta = 60^\circ$)

- ・ $\theta = 30^\circ$ 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Fig.9に示す。角度 30° 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° から 45° 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。

D. 考察

本試験はブタから採取した静脈片を展開し、試験治具に固定することで実施した。展開した静脈片は全周性に固定されている固定端となっており、生体内での静脈形態である扁平性や血

管そのものの自由度が本試験と異なっている。そのため、取得された穿孔荷重を絶対値として解釈することは注意を要する。しかし、比較試験としてのダイレータ挿入角度に対する穿孔の有無や、相対的な穿孔荷重の比較はモデル試験として十分意味があるといえる。

E. 総括

セルジンガー法の中でも特にガイドワイヤー、ダイレータ挿入時に、工学的側面から留意点を見出し提言することを目的に、医師の挿入力の調査とさらに臨床を模擬する評価系を構築、試験を実施した。試験の結果、以下の結論が得られた。

- ・ ダイレータと血管の角度が 30° 未満では血管穿孔が起こる可能性は低い。

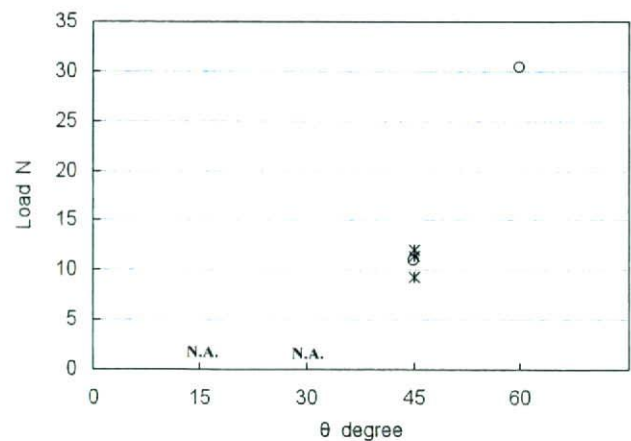


Fig.9 挿入角度と荷重の関係

・挿入角度が 45°以下では、10N 以上の力が作用しなければ、血管穿孔の可能性は低いが、ダイレー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ある。

・挿入角度が 60°の場合 10N 以上の荷重が作用すると、ダイレータが血管を穿孔させる可能性が高い。

これらは、現実的には起こりづらい状況であるが、医師は十分にこれらについて留意する必要がある。

F. 謝辞

本研究を行うにあたり、日頃より臨床に携わる先生にご指導、ご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。

有田誠先生(エドワーズライフサイエンス社)、岩崎清隆先生(早稲田大学)、梅津光生先生(早稲田大学)、村垣善浩先生(東京女子医科大学脳神経外科)、ほか関係者の皆様。

G. 参考文献

- (1) 「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) <http://www.wam.go.jp>
- (2) David C. McGee, Michael K. Gould (2003) Preventing Complications of Central Venous Catheterization. N Engl J Med 348:1123-1133
- (3) Mansfield PF, Hohn DC, Fornage BD et al

(1994) Complications and failures of subclavian-vein catheterization: N Engl J Med 331:1735-1738

(4) T. Andrew Bowdle (2002) Central line complications from the ASA Closed Claims Project: an update: ASA Newsletter. 66:11-2, 25

(5) Denys BG, Uretsky BF (1991) Anatomical variations of internal vein location: impact on central venous access: Crit Care Med. 19:1516-9

(6) William C. Shoemaker, George C. Velmahos, Demetrios De-metriades(2003) Procedures and Monitoring for the Critically Ill, WB Saunders Co, Philadelphia

H. 研究発表

1. 学会発表

(1) 植松美幸, 有田誠, 岩崎清隆, 田中隆, 太田友博, 梅津光生, 土屋利江:頸静脈に対するガイドワイヤーおよびダイレータの挿入角度による血管穿孔可能性を評価する試験法の構築, 第46回日本人工臓器学会大会(2008).

(2) M., Uematsu, M., Arita, K., Iwasaki, T., Tanaka, T., Ohta, M., Umezu, T., Tsuchiya, "Development of Evaluation Test Method for the Possibility of Central Venous Catheter Perforation Caused by the Insertion Angle of a Guidewire and a Dilator", The 13th International Conference on Biomedical Engineering (2008)

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

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（鄭淑連） 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨

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差性の評価ができるかの検討をおこなった。その結果、用いたポリマー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。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。

A. 研究目的

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。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。

B. 研究方法

①化学物質

Polymer は以下の種類を用いて実験を行った。P1 [poly (_L-lactide-glycolide copolymer, PLLG, without a catalyst), the average number of molecular weights (Mn) = 3,540], P2 [poly (_L-lactide-glycolide copolymer, PLLG, with SnOct₂), Mn = 3,580], P3 [poly(_L-lactide-caprolactone copolymer, PLLC, without a catalyst), Mn = 3,550], and P5 [poly (_{D,L}-lactide-glycolide copolymer, PLGA, without a catalyst), Mn = 3,110].すべての

polymers は Taki Chemical Co., Ltd. (Hyogo, Japan)から購入した。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 25μL 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 40μM 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 100 ul 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。

C. 研究結果

① マウスの体重の変化 (table 1)

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) (Fig.1)

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 $S \geq 3$ 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 (Fig.2)

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- α , IFN- γ , 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- γ は濃度依存的に発現量が増えているのに対して、TNF- α および IL-2 は逆相関が見られた。

D. 考察

今年度は昨年度検討した医用材料の一種であるポリマーのアレルギー性の評価を h-CLAT による結果と LLNA の結果との間で比較検討した。その結果、h-CLAT で陰性であった P2 は LLNA でも陰性であり相

関がみられた。しかしながら、h-CLAT で陽性であった P1, P3, P5 のうち単独で LLNA 陽性の判定基準を上回ったのは P3 のみであった。そこで陰性レベルの反応しかおこさない 0.01%DNCB とこれらポリマーを混合して塗布した結果、P1, P3, P5 いずれも LLNA 陽性の判定基準を上回った。一方、P2 は 0.01%DNCB と混合しても陰性のままであった。これらのことから h-CLAT と LLNA の結果には相関がある傾向があることが分かった。しかしながら、P3 以外のポリマーでは、それぞれの単独塗布では反応が弱かったことから、今回使用した条件では皮膚透過性が低かったことも考えられる。今後、ポリマーのサイズと皮膚浸透性の関連性、および感差性との関係を詳細に検討する必要があると思われ、来年度の課題として取り組みたいと考えている。

E. 結論

動物実験の代替法を確立するためには、in vivo と in vitro の結果を比較・検討するような評価実験をし、in vitro の系が in vivo の系の結果を十分に反映しているということを示さなければならない。そこで我々は生分解性ポリマーのアレルギー性の評価を in vitro の系である h-CLAT で行うことが可能であるかを検討するため、h-CLAT での結果と LLNA の結果の間で比較・検討した。その結果、両者の結果に相関を見いだすことができた。しかしながら今年度の結果はまだ予備段階的なものであり、今回の in vitro 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はさらなる検討が必要であるが、これまでに生分解性ポリマーにおける

アレルギー性を評価した報告はなく、この研究結果は in vitro でのリスクアセスメント手法開発に多いに役に立つと思われる。

F. 研究発表

2. 学会発表

鄭連淑、加藤玲子、土屋利江：生分解性ポリマーの遅延型アレルギー性の in vitro と in vivo 試験による評価 2008年11月17～18日 東京

鄭連淑、加藤玲子、土屋利江：Skin sensitizer assessments of Local Lymph Node Assay using biodegradable polymers 第8回日本再生医療学会総会 2009年3月5～6日 東京

Condition	P1		P2		P3		P5	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
AOO ^a	22.2 ± 0.1	23.2 ± 0.9	19.3 ± 0.8	21.4 ± 2.2	19.5 ± 0.1	20.5 ± 0.7	19.3 ± 0.8	21.4 ± 1.2
DNCB 0.01%	21.5 ± 0.5	24.0 ± 1.6	20.7 ± 0.4	22.0 ± 0.4	19.0 ± 1.2	20.4 ± 1.3	20.7 ± 0.4	22.0 ± 0.4
DNCB 0.5%	20.4 ± 2.1	21.4 ± 2.4	20.25 ± 1.0	21.0 ± 0.9	20.0 ± 1.2	21.2 ± 1.9	20.2 ± 1.0	21.0 ± 0.9
P ^b 0.5%	22.6 ± 0.9	24.1 ± 0.6	19.1 ± 0.8	20.5 ± 1.0	20.4 ± 1.7	21.8 ± 1.4	19.1 ± 0.8	20.5 ± 1.0
P 1%	21.3 ± 0.7	22.4 ± 1.0	19.7 ± 0.2	21.0 ± 0.6	20.2 ± 1.6	21.2 ± 1.8	19.6 ± 0.2	21.0 ± 0.6
P 3%	22.6 ± 1.3	23.7 ± 1.7	19.8 ± 1.4	21.0 ± 1.7	20.7 ± 0.9	20.1 ± 1.4	19.8 ± 1.4	21.0 ± 1.7
P 5%	21.4 ± 1.1	22.8 ± 0.6	20.0 ± 1.1	21.5 ± 0.7	20.0 ± 0.9	21.6 ± 0.6	19.4 ± 1.1	20.5 ± 1.2
DNCB0.01%+P 0.5%	20.2 ± 0.6	21.5 ± 1.4	19.9 ± 0.8	20.9 ± 0.7	19.0 ± 0.9	20.2 ± 0.6	19.9 ± 0.8	20.9 ± 0.7
DNCB0.01% + P 1%	21.4 ± 1.0	22.0 ± 1.3	19.4 ± 0.4	21.7 ± 0.5	20.6 ± 2.2	21.7 ± 2.3	19.4 ± 0.4	21.7 ± 0.5
DNCB0.01% + P 3%	21.0 ± 1.7	21.3 ± 0.8	19.2 ± 0.2	20.3 ± 0.9	19.6 ± 1.7	20.7 ± 2.1	19.2 ± 0.2	20.3 ± 0.9
DNCB0.01% + P 5%	22.5 ± 1.4	23.4 ± 1.2	19.6 ± 0.8	21.1 ± 0.6	19.5 ± 1.1	21.6 ± 0.8	19.6 ± 0.8	21.1 ± 0.6

^a acetone : olive oil (4:1)

^b P represents used.

P1: poly (L-lactide-glycolide copolymer, PLLG);

P2: poly (L-lactide-glycolide copolymer, PLLG, with SnOct₂);

P3: poly (DL-lactide-glycolide copolymer, PLGA);

P5: poly (L-lactide-caprolactone copolymer, PLLC)

表 1

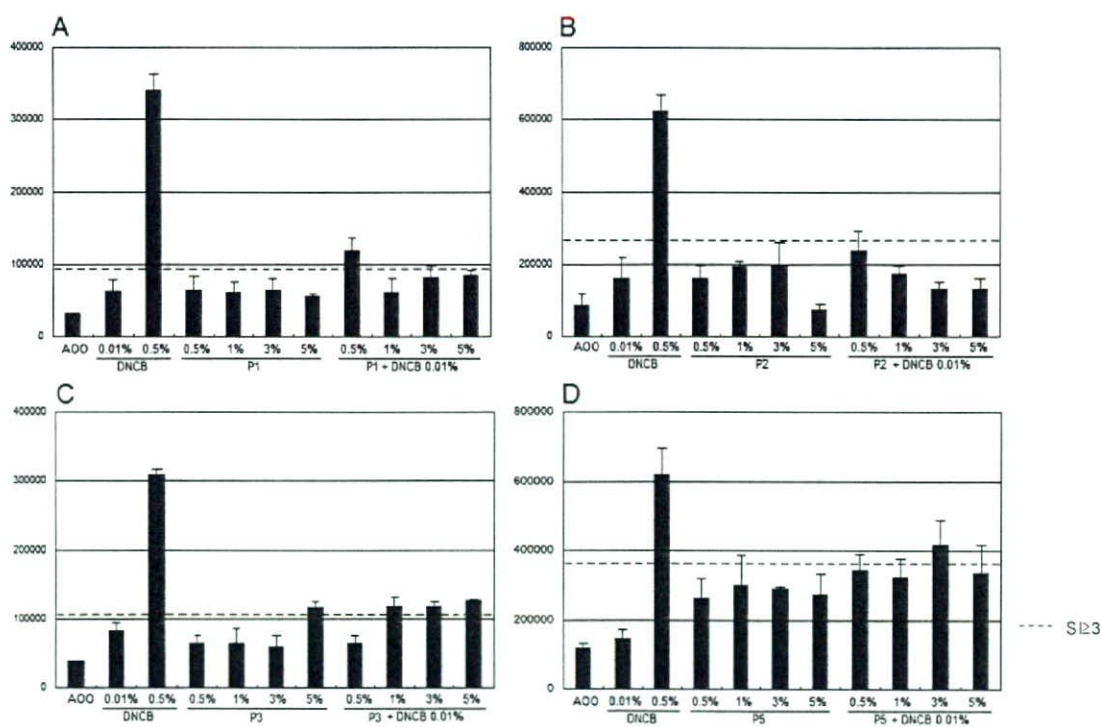


图 1