

200940013A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュ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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成22(2010)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

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

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

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

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

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

迫田 秀行

6. 吸収性材料による長期生体影響（神経毒性）のリスクアセスメント手法開発

角田 正史

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

東藤 貢

8. 流体力学による脳動脈瘤用ステントのリスクアセスメント手法開発

太田 信

9. 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

石川 格

10. 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

11. 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

12. 医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

中岡 竜介

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 総括研究報告

平成21年度総括研究報告書

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

主任研究者 土屋 利江 大阪大学医学部附属病院 未来医療センター

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、12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

ヒト正常骨芽細胞 (NH0st) に対する分化促進機能を示すスルホン化プレートをモデル材料として、医用材料の機能評価や生体適合性評価におけるプロテオミクス解析の有用性について検討した。NH0st の分化促進を司る機能性蛋白質を同定するため、スルホン化プレートに吸着する蛋白質の定量解析を行った。ウシ胎児血清蛋白質と比較して含量が2倍 ($p < 0.05$) 以上増加した蛋白質が134スポット検出された。同吸着蛋白質の96種類の蛋白質が同定され、NH0st の分化促進に関与すると思われる増殖因子関連蛋白質 (IGF2、IBP1-4、TGBR3)、骨代謝関連蛋白質 (TETN、MIME、SPP24、VTDB)、細胞接着関連蛋白質 (VASP、HABP2、CO1A2、COMP、FINC)、脂質結合性蛋白質 (FABPL、PEBP1)、Toriose-Phosphate 結合性蛋白質 (TPIS) の含量がウシ胎児血清蛋白質と比較して有意に濃縮されていることが判明した。

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

カーボンナノチューブについて、繊維状の形態を持つものは、染色体の数的異常を誘発し、特殊な処理により糸玉状に形態を変えたものは、数的異常を誘発しなかった。

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。チタン合金に高いアパタイト形成能を付与するために、NaOH 処理後に CaCl_2 処理又は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理を施して、材料表面にカルシウムの導入を試みた。表面処理を施したチタン合金等の細胞毒性試験及び骨芽細胞適合性試験を実施した。未処理の Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示すが、NaOH 処理によって細胞毒性は認められなくなった。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb 及び Ti では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl_2 処理及び NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理の順に、骨芽細胞の分化レベルを促進させた。NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理は、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与するとともに、骨芽細胞の分化を促進させることが明らかになった。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ることが確認された。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

人工心臓弁を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、それらの原因となる日本人におけ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 タイピングを行った。血液凝固因子第10 (F10) の SNP : rs3211736 で、人工心臓弁の機能不全の有無間での有意なアレル頻度の差が認められた。

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

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解析し、得られた不具合要因の中から既知のものを除き、今後対策が必要なものの抽出を試みた。新たに5例の抜去インプラントを入手し、これらのインプラントについて不具合要因解析を行った。バイポーラ型人工骨頭では、インピンジによるリム部の破損や骨頭保持機構が弱点として浮かび上がってきた。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と考えられた。

6. 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톤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ヵ月観察した。神経系への影響を脳各部位の神経伝達物質及びその代謝産物で評価した。大脳中のセロトニ

ン、セロトニンの代謝産物、ノルエピネフリン濃度について、高濃度DBT含有PLGC膜埋め込み群で対照群より有意な高値が観察され、スクリーニング手法としての可能性が示唆された。

7. コンピューター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

膝関節の屈曲動作をコンピュータ上で再現するために、バーチャル・膝シミュレータの開発を試みた。このシミュレータは実験で使用される実際の膝シミュレータの構造を考慮しており、実験結果と数値解析結果との対応が容易であることが長所として挙げられる。下肢の屈曲動作を簡易的に模擬しているため、各動作のメカニズムが理解しやすく、また各境界条件を変化させることで、様々な屈曲動作に対応することが可能である。

8. 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コンピュータシミュレーションによるリスクアセスメントでは、ステントストラットが血流に与える影響を基礎的に調べ、知見を増やす必要性と、既に市場にあるステントの血流障害能力を計算できるようになる必要がある。そこで、血流障害能力を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。コンピュータを用いた数値流体解析による手法の開発を行った。

9. 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

膝関節の屈曲動作をコンピュータ上で再現するために、バーチャル・膝シミュレータの開発を試みた。このシミュレータは実験で使用される実際の膝シミュレータの構造を考慮しており、実験結果と数値解析結果との対応が容易であることが長所として挙げられる。下肢の屈曲動作を簡易的に模擬しているため、各動作のメカニズムが理解しやすく、各境界条件を変化させることで、様々な屈曲動作に対応することが可能である。

10. 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

ガイドワイヤー使用時に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った。特に低侵襲治療が進んだ医療において重要な役割をもつカテーテル、ガイドワイヤーを用いた手技に着目した。前年度はガイドワイヤー使用時における定量化した。今年度は、実際の手技を客観的なデータとして取得し、より直感的な情報提供を目指した。

11. 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

ポリマーの合成の際、触媒としてジブチルスズ化合物やオクチルスズ等の有機スズ化合物用いられている場合があり、ジブチルスズ化合物の不純物として含まれる可能性のあるトリブチルスズ化合物に焦点をあて、h-CLAT と LLNA の比較実験を行った。

12. 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

医用材料の埋植後に生じる生体反応と材料特性との関連性を考察するため、材料と細胞との *in vitro* での相互作用解析を通して材料表面特性が細胞に与える影響についての検討を行った。官能基に加えて材料表面の接触角に着目し、自己組織化膜で調製した官能基表面と細胞との相互作用解析と考察を行った。

分担研究者

土屋利江 大阪大学医学部付属病院
未来医療センター

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 部長

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 室長

迫田秀行 国立医薬品食品衛生研究所
療品部 主任研究官

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。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。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。平成 21 年度は、昨年度に同定された各種蛋白質の定量解析を行ったと共に、細胞側の挙動変化を追跡するため、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、過去に実施した遺伝子発現解析結果と比較検討した。

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

カーボンナノホーンおよび 3 種のカーボンナノチューブについて、細胞毒性、染色体異常試験、および粒度分布測定を行い、比較検討した。

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、 γ ネイル、髄内釘、人工関節などがあり、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いる。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きた。動物実験に頼らず、試料の形態を選ばず、定量的な解析が可能なアパタイト形成能の評価法の確立を目指した。アルカリ加熱処理を施したチタン合金はすでに実用化されており、NaOH 処理したチタン合金の安全性に問題はないと考えられるが、カルシウム導入したチタン合金の安全性は不明である。NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施したチタン合金等の細胞毒性試験及び骨芽細胞適合性試験を実施し、カルシウムを導入したチタン合金等の生物学的安全性を評価した。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

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。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。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。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。一つの原因と考えられるパルス形成に関してはその形成メカニズム自体が不明である。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やパルスの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。日本人の人工心臓弁（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。

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は、本邦では年間約 15 万例が行われており、毎年増加している。不具合により再置換される事例も増加している。再置換の必要のない、あるいは、再置換が容易でなおかつ成績のすぐれたインプラントの開発が急務となっている。人工関節の不具合を考える上で重要なことは、不具合が全てインプラントに起因するわけではないということである。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。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診療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. 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

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利点がある。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（重合に触媒として使われるジブチルスズ (DBT) やオクチル酸スズ(2-エチルヘキサノ酸スズ) (OT) など) に曝されるため、その安全性の評価は課題となっている。人工硬膜のモデルとして、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、ラットに脳外科手術を行い、頭蓋骨をくり抜き、頭蓋内に PLGC 膜や DBT や OT 濃度が異なる PLGC 膜を埋め込み、観察期間の後に神経毒性の評価を行ってきた。昨年の研究で、モデル実験として、頭蓋骨のくり抜き直径を 8mm にして、2ヶ月間の観察を行うことが現時点で適当と言う結論となった。今回の研究では、頭蓋骨くり抜きの直径を 8mm に設定し抗生物質を投与し感染防止の手段を講じた上で、PLGC 膜を埋め込んだラットについて、観察期間 2 ヶ月の後に、脳各部位の神経伝達物質及びその代謝産物を測定し、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。

7. コンピューター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

人工膝関節の安全性や耐久性は、超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) インサートの安全性と耐久性で決定されると言っても過言ではない。したがって、膝関節の動作状態における UHMWPE インサートの応力状態を知ることが重要である。本研究では、これまで CAD データと非線形バネモデルから構築した簡易解析モデル、骨と軟組織から構成される部分的な膝関節モデルに人工膝関節の CAD データを組み込んだ実構造 TKA モデル等を作成し、応力解析を行い得られた結果の妥当性を検証してきた。しかし、実験との対応が困難であること、また実際の動作状態をより高精度で再現するには、筋肉の作用を考慮することが必要等の問題点が生じた。本研究では、実験との対応が比較的容易であり、さらに筋肉の影響を導入することが可能なバーチャル膝シミュレータモデルの構築を試みた。

8. 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

未破裂脳動脈瘤を治療することにより、破裂を未然に防ぐことが重要であるが、この治療によって重篤な合併症を引き起こす可能性もあり、より安全で確実な治療方法の確立が期待されている。近年では、ステントと呼ばれる金属の網状の筒を瘤部の親血管に留置し、動脈瘤内への血流を阻害させることによって内部の速度を減少させる手法が行われ始めた。現在この新しい手法に対して血流における流体力学的観点から有用性を検証する研究が行われており、コイル塞栓術では難しいネックの広い瘤に対して大幅な流速および壁せん断応力の減少が示されている。本研究では、血流阻害能力を流体力学的に定量化する手法を開発し、特にステントストラットの阻害能力の基礎的検討と、実際のステントの血流状態の再現をコンピュータシミュレーションによって試みた。

9. 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

昨年度、光学式 3D デジタイザを用いて人工股関節ステムや骨固定プレートの形状測定を行って形状データを作成し、それを用いて有限要素解析を行った。今年度は、この形状計測を抜去人工股関節の超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) ライナーの摩耗量測定に応用すれば摩耗量の新しい測定技術になると考え、

このような応用をする際の課題とその対策について研究を行った。光学式 3D デジタイザが UHMWPE ライナーの摩耗量測定にどこまで応用可能かどうかを数理的な摩耗モデルを用いて検討を行った。摩耗前の形状を抜去ライナーの形状測定データから推定するための計算法の考案を行った。テストデータを用いた検証では、この計算法の前提条件が成り立つような形状データにおいては、摩耗前の摺動面形状を正確に予測しうる結果が得られた。そこで、実際に測定データに対してもこの計算法を適用し、摩耗前形状を推定した。その結果を元に摩耗量の算出を行った。

10. 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

医療機器の使用には 1) 医師、2) 患者、3) メーカーという三者が関わることになる。

本研究の目的は、医師の経験に基づく情報提供の流れとは別に、手技を評価する指標を抽出することで、客観的なデータに裏打ちされた情報提供を行うことである。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、セルジンガー法における留意点を見出すことに主眼をおいた。具体的には、手術作業記録のコンテンツ化であるが、1) 空間把握、2) 作業パスの 2 つの方向からアプローチする。医師のもつ空間的なイメージを直感的に把握可能とし、作業のポイントを抽出できることを期待する。

11. 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

これまでに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) や Local Lymph Node Assay (LLNA) が使用されてきている。しかしながら近年、動物愛護の観点から動物実験の代替法の確立が望まれており、国際的にも種々の *in vitro* 評価法の開発が進められてきている。

human Cell Line Activation Test (h-CLAT) は、日本の化粧品会社を中心に開発された *in vitro* 評価法である。この方法は感作誘導時に抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞が活性化することが重要な役割を果たしていることに着目し、ランゲルハンス細胞と性質の似たヒトの単球系白血病細胞株である THP-1 を用い、活性化時に発現の上昇がみられる CD86 および 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。医療機器および医用材料のアレルギーのリスクアセスメントに適応出来るかを検討するため、医用材料

として使用されるポリマーを対象として検討してきた。今年度はポリマー合成の際、重合触媒として用いられるジブチルスズの不純物として混在している可能性があるトリブチルスズに着目し h-CLAT で評価できるかの検討をおこなった。LLNA でのトリブチルスズの感作性評価の報告もないことから、LLNA での解析もおこない、両者の結果を比較検討した。

12. 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

体内埋植型医療機器での炎症反応による不具合がいくつか報告されているが、炎症反応に関わらず埋植型医療機器によって生じる不具合は、主に機器を構成する材料に起因していると考えられる。細胞の接着や接着直後の遺伝子発現変化においては、材料表面の水に対する接触角に影響されることが既に報告されている。そこで、昨年度から、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て検討を行っている。さらに、今年度は細胞分化以外に細胞の恒常性維持に重要な役割をもつ細胞間連絡機能への影響についても検討を行った。

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

スルホン化プレート調製し、乾燥後、クリーンベンチ内で UV を 10 分間照射して滅菌して使用した。ヒト正常骨芽細胞の培養は、NH0st (CAMBREX, 1D, Female, 0/C) は三光純薬から購入した。培地としては、5 mM β -グリセロリン酸ナトリウム、10 nM デキサメタゾン、10% 牛胎児血清を含有する α -MEM (GIBCO) 培地を使用した。

スルホン化プレート吸着蛋白質の調製は、スルホン化トレイに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、同血清を除去した。粗蛋白質画分を回収し、Chaotropic Membrane Extraction Reagent 3 (Reagent 3) に溶解後、蛋白量を測定した。得られた粗蛋白質は 2D Clean-Up Kit により精製し、試験に供するまで凍結保存した。また、ウシ胎児血清 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。

細胞由来蛋白質の調製

スルホン化シャーレ上で培養した NH0st を常法に従ってトリブチン処理により剥離した後、冷 PBS で洗浄後、細胞数を計測した。同細胞から得られた蛋白質試料は試験に供するまで凍結保存した。

二次元電気泳動とスポット分取は、蛋白質の蛍光

標識 (Minimal labeling 法) 及び二次元電気泳動は標準プロトコールに従って実施した。

ウシ胎児血清蛋白質及びスルホン化トレイ吸着蛋白質は、還元 (TBP)、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 μ 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、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。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、データ解析を行った。

泳動終了後、ゲル固定及び DeepPurple 蛍光染色し、Typhoon 9400 を使用してイメージを取り込んだ。DeC 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、ProHunter を用いて各スポットを自動分取した。

MS 解析用ペプチド試料の調製

In-Solution Digestion

得られたペプチドは脱塩し、Speed Vac (Savant) で乾燥させた後、4°C で保存した。スルホン化プレート吸着蛋白質は直接、NH₄OH 由来蛋白質は TMT 標識した後、LC-MS/MS 分析に供した。

LC-MS/MS 解析

リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ-Orbitrap (Thermo scientific) を使用した。Nano-LC は、DiNa-A オートサンプラー (KYA Tech) を装備した DiNa システム (KYA Tech) を使用した。Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1%ギ酸含有 2%アセトニトリル) と B 溶媒 (0.1%ギ酸含有 80%アセトニトリル) を使用した。流速は 300 nl/min とし、サンプル注入 (0.5-1 mg) はオートサンプラーを使用した。分析で得られた MS データに基づいて、Proteome Discoverer ソフトウェア (Thermo scientific) を使用して作成した Reject mass list を method file に登録し、同様の分析を数回繰り返すことにより、MS/MS データを取得するペプチド数を増加させた。

2DLC-MS/MS 解析 Nano-LC の 2DLC 用強陽イオン交換カラムの流路を開放した状態でサンプルを注入し、ペプチドを吸着させた後、20 mM 重炭酸アンモニウム溶液 20 ml を送液した。溶出するペプチドをオンラインでトラップカートリッジに吸着させ、陽イオン交換カラムの流路を閉鎖して、1DLC-MS/MS 分析と同様の条件により、グラジエント溶出させた。質量分析装置は Reject mass list の利用も含めて、1DLC-MS/MS 分析と同様に設定した。

TMT 標識ペプチドの LC-MS/MS 解析

スキャンデータを取得する FT analyzer は、分解能 30,000、測定質量範囲 m/z 350-1,200 に設定した。タンパク質同定に必要な MS/MS データは、上記と同様の data dependent mode により、CID で測定し、ペプチド定量に必要なレポーターイオンを HCD (Normalized collision energy 45 kV、Activation time 100 ms) により検出した。

MALDI-TOF/TOF 解析

脱塩済みペプチド試料 2 ml をチューブに採取し、等量の 50%アセトニトリル/CHCA (Sigma) 飽和溶液を加え攪拌し、同混合液 1 : 1 を MALDI 測定用ターゲットの各ウェルにスポットした。質量分析装置としては、アプライド社製 ABI4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer を用いた。MS スペクトルの測定は Reflector/Positive ion mode (測定質量範囲 m/z 800-4000, 加速電圧 20 kV) で行い、CHCA 由来のバックグラウンドピークを Reject mass list に指定した Interpretation method により、イオン強度の高い上位 20 種のペプチドピークの MS/MS スペクトルを自動的に取得した。

蛋白質の同定と定量

定性解析

LC-MS/MS 解析において得られた MS データを蛋白質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア (Thermo scientific) にアップロードした後、MASCOT 検索ワークフローを利用してタンパク質の同定を行った。データベースとしては Swiss Prot を使用した。また、同定される蛋白質数を増加させるため、繰り返し測定時に利用する Reject mass list も同ソフトウェアを利用して作成した。

MALDI-TOF/TOF 解析における蛋白質の同定は MS 及び MS/MS データに基づき、アプライド社製 GPS Explore ソフトウェアを用いて行った。検索エンジンとしては MASCOT を利用し、データベースとして Swiss Prot を使用した。

Progenesis LC-MS ソフトウェア解析

非標識条件下における蛋白質の定量解析は Progenesis LC-MS ソフトウェア (Nonlinear Dynamics) を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた MS データ (n=2) を同ソフトウェアにインストールした後、リテンションタイム補正、ノイズ除去、価数及び統計解析結果等によるフィルタリングを行った。同ソフトウェアにより作成したピーク情報を MASCOT 検索に供し、得られた情報を同ソフトウェアにインストールすることにより、蛋白質の同定と発現定量解析を行った。

TMT 標識ペプチドの定性・定量解析

TMT 標識ペプチドの LC-MS/MS 解析において得られ

た MS データを Proteome Discoverer ソフトウェアにアップロードした後、CID/HCD 併用 MASCOT 検索ワークフローを利用して蛋白質の同定と発現量の比較定量を行った。

遺伝子発現解析

未処理及びスルホン化プレート上で 24 時間培養した NH0st 由来の細胞内蛋白質の同定結果に基づいて、平成 19 年度に実施した NH0st の DNA チップデータを再解析した。

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

NHas：単層カーボンナノホーンで、炭素原子のみからなっており、先の閉じた形状をしており、単独で存在しておらず、平均直径 50-100nm の凝集体として存在している。(図 2)

CNT-1: 多層カーボンナノチューブ (図 3)

CNT-1*: CNT-1 を高速気流中衝撃法で表面改質したもの。乾燥状態で、平均粒子径 $2.8\mu\text{m}$ の凝集体。(図 3)

CNT-2: 多層カーボンナノチューブ

細胞毒性試験、染色体異常試験を実施した。ナノマテリアルの分散液の調製を行い、分散液中の粒子径測定をレーザー解析/散乱式粒子径分布測定装置で測定した。

NHas の細胞への取り込みは、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

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

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 β 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。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、従来から骨接合材に汎用されているチタン合金として、Ti-6Al-4V を用いた。

いずれの試験材料も直径 14.0 mm、厚さ 1.0 mm の円盤状に加工した後、#400、#800 及び #1200 の順にシリコンカーバイト製耐水研磨紙を用いて、純水中で表面研磨仕上げを施した。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。

表面処理

試験材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°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°C で 24 時間静置した (NaOH + CaCl_2 処理)。

前述の NaOH + CaCl_2 処理とは別に、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°C で 24 時間静置した (NaOH + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理)。

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 $4.0\mu\text{m}$ 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、真空雰囲気中で測定した。ファンダメンタルパラメーター法を用いて、試料表面のカルシウム濃度を求めた。

細胞毒性試験

試料の細胞毒性は、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、直接接触法による V79 コロニー法を用いて試験した。

骨芽細胞適合性試験

試料の上で直接骨芽細胞を培養し、骨芽細胞の増殖及び分化をそれぞれ指標として、試料の骨芽細胞適合性を評価した。

細胞増殖の測定：骨芽細胞の増殖の指標として、細胞数を測定した。

細胞分化の測定：骨芽細胞の分化の指標として、ALP 活性を測定した。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

血液採取：久留米大学医学部外科学講座において、人工心臓弁置換手術を過去に施された患者のうち、人工心臓弁の機能不全が認められる患者 15 名および人工弁の不具合が今のところ認められない患者 11 名からの血液を PAXgene Blood DNA Tubes を用いて 8.5mL 採血した。検体として採取した血液は、久留米大学医学部外科学教室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。

DNA 抽出：QIAamp Blood Mini KIT を用いて、採取した血液より DNA を抽出した。

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の 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 (α-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)、TGFβ (transforming growth factor-β) 1、TGFβ レセプター I (TGFβ RI)、TGFβ レセプター II (TGFβ RII) の4遺伝子について計6SNPs を選択し、総計29SNPs (表2) についてタイピングを行った。

SNP タイピングは、以下に記す方法で行った。まず、PCR を行いターゲットの SNP を挟む 200~400bp 程度の増幅産物を得た。次に、得られた PCR 産物を Template として用いて Typing PCR を行った。PCR の酵素は、Go Taq Flexi DNA Polymerase を用いた。電気泳動にてバンドの有無を確認して判定した。プライマー設計及び PCR 条件設定は株式会社イムノダイアグノスティックラボラトリーにて行われた。有意差検定:Fisher の正確確率検定 (Fisher's exact test) により両側検定を行った。

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

抜去インプラントの入手：大阪大学より抜去インプラントおよび診療情報を入手した。本年度はあらたに5例の分析を行った。内訳は全例がバイポーラ型人工骨頭であった。

抜去インプラントの肉眼観察：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、IXY digital 55 および IXY digital 510IS) を用いた。破断面の走査型電子顕微鏡観察：今回分析した抜去インプラントの中に、破断を生じている試料があったため、その破壊様式を推定することを目的に破断面の観察を行った。

UHMWPE コンポーネントの赤外分光光度計による分析：UHMWPE コンポーネントを分解、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 の試料を表面に垂直に切り出した。赤外分光光度計 (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。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。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、検量線を作成した。摩耗量測定：人工股関節の UHMWPE コンポーネントの摩耗量を推定するため、UHMWPE コンポーネントの形状を非接触式三次元形状測定機 (コニカミノルタ、VIVID 9i) により測定した。他の文献との比較を容易にするため、体積摩耗量に加え、線摩耗量とそれぞれの年あたりの数値の算出も行った。線摩耗量は摺動面における骨頭の移動量であり、寛骨臼側コンポーネントと骨頭との相対位置から計算できるため患者の X 線像などから求めることができ、臨床報告などで多用されている。ここでは骨頭径を用いて、体積摩耗量から線摩耗量を算出した。

力学試験による破断面特徴の再現：SEM で観察された UHMWPE コンポーネントの破断面の特徴を再現することを目的に、力学試験を行った。

診療情報との照合および総合分析：目視観察や FTIR 測定など、抜去インプラントの解析から得られた情報と、診療情報を統合し、症例ごとに不具合要因について考察を行った。

6. 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

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、一般に触媒として汎用される濃度の OT を含有する、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)。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。

PLGC 膜：モデル品 PLGC 膜は、OT の濃度はスズ濃度として最大 20ppm を含有する PLGC 膜で、三重膜の構造をもったモデル品を作製した。高濃度 OT 含有 PLGC 膜 OT 濃度をスズ濃度換算で 200ppm とし、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜は、同様に構造は三重膜で、残存スズ濃度換算で DBT 濃度を 100ppm としてテーラーメイドで作製した。三種類の膜はそれぞれ、清潔下に約 6.5mm 四方に切り出した後、角を切り落として八角形にして、埋め込み用試料とした。

埋め込み時のモデル品 PLGC 膜の重量の平均値 ± 標準誤差は 14.8 ± 0.6mg、高濃度 OT 含有 PLGC 膜 12.7

± 0.8mg、高濃度DBT含有PLGC膜13.6 ± 0.4mgであった。

ラットへの手術の方法、観察期間：ラットの埋め込み手術時の群別の平均体重±標準誤差は、control群 376.0 ± 15.7 g、モデル品PLGC膜埋め込み群 348.5 ± 10.3 g、高濃度OT含有モデル品PLGC膜埋め込み群 356.7 ± 7.6 g、高濃度DBT含有モデル品PLGC膜埋め込み群 354.5 ± 7.6 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) に先端がとがっていないラット用補助イヤバーを用い、固定した。頭蓋骨から直径8mmの円形の頭蓋骨片をくり抜いた。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すのみとした。骨片を戻した後に骨膜及び皮膚を、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5mg/kgの用量で腹腔内注射を行った。術後2ヵ月、同じ群から2匹ずつ一つのポリカーボネート製のケージに入れ飼育した。ラットの体重を毎日測定した。

脳の肉眼的観察、膜回収、脳の分割、神経伝達物質の抽出：手術の2ヵ月後、断頭によりラットを安楽死させ、脳を摘出した。脳の表面から膜を回収し、膜重量を測定した。氷冷下でGlowinski and Iversen (1966)の方法で7部位 (大脳 cerebrum、小脳 cerebellum、延髄 medulla oblongata、中脳 midbrain、線条体 corpus striatum、視床下部 hypothalamus、海馬 hippocampus) に分割した。分割した脳は重量を測定しながらホモジェナイズし、神経伝達物質及びその代謝産物を抽出した。

統計解析：各神経伝達物質濃度及び代謝産物の濃度の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。またDOPAC/DA、HVA/DA、5-HIAA/5-HTを計算し、同様の解析を行った。なお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。

7. コンピューター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

開発したバーチャル・シミュレータの機械構造部分は実際の実験用シミュレータを参考にして構築した。膝関節部は、成人男性の下肢のCT画像とMRI画像を用いて作成した3次元膝関節モデルを利用した。膝関節は、大腿骨、脛骨、膝蓋骨、膝蓋腱から構成されている。また、側副靭帯は単純化したモデルを採用した。膝関節モデルに装着した人工膝関節は、臨床応用されている現行の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ものである。シミュレータ全体を4節点4面体要素で分割し有限要素解析モデルを構築した。節点数は136459、要素数は590213である。

材料モデルとしては、機械構造部、人工関節の大腿・脛骨コンポーネント、大腿骨、脛骨、膝蓋骨はすべて剛体を仮定した。応力状態に着目しているUHMWPE製の脛骨インサートについては、圧縮実験から得られた弾塑性応力-ひずみ挙動を3直線近似でモデル化したものを採用した。力学的境界条件としては、機械構造部上部の臀部にあたる部分に300Nの一定負荷を鉛直下向きに作用させた。また、大腿四頭筋については0荷重からスタートし一定時間後に300Nに達するように設定した。これらの条件の下、生体膝の屈曲動作の再現は臀部が鉛直下方に移動することで行った。解析には陽解法動的有限要素解析ソフトLS-DYNAを用いた。

8. 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

脳動脈瘤形状およびステントストラット形状の作成：脳動脈瘤形状は、直線血管モデルを使用した。動脈瘤モデルの各寸法は、親血管が直径4mm、動脈瘤の直径が10mm、ネックの広さが5mmである。

実形状ステントによる血流測定：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)により脳動脈瘤の撮影を行い、DSAから出力された医療用画像データを持ちいて脳動脈瘤形状の再構築を行った。脳動脈瘤用のステントは現在市場において最もストラットが細かいSYLKステントを用いた。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。

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し、密度は1050 [kg/m³]、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時不変とした。また、脳動脈におけるレイノルズ数を約240と仮定したので、入口端では0.200 [m/s]の一樣流を設定した。出口端では圧力0 [Pa]を設定、血管・瘤・ステント壁面はNo-slipと設定した。ニュートン流体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

数値流体力学解析ソルバである Fluent6.3(Fluent, Inc., NH.)を使用した。

9. 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

光学式3Dデジタイザによる摩耗量測定の可能性の検証

形状測定装置の測定誤差がUHMWPEライナーの摩耗量測定値に与える影響を考察するために、次のような仮定の元にUHMWPEライナーの摩耗形状をモデル化した。(図18, 図19)

- 摩耗前の摺動面形状は半球である。
- 摩耗は一方向的に進む。
- クリープ変形は考慮しない。
- 摩耗前の摺動面半径と摩耗によって生じた摺動面の半径は同じとする。

摩耗体積 V_{wear} を半径 r , 最大摩耗深さ d , 摩耗方向角度 Ψ の関数として $V_{wear}(r, d, \Psi)$ と表すこととした。本研究では, $r = 11$ mm と $r = 14$ mm の2つのUHMWPEライナーについて, 摩耗方向および最大摩耗深さを変数として, 摩耗体積, 絶対誤差 ε , 相対誤差 ν の値を求めた。 ε と ν の値を求める際には,

測定誤差量 σ の値を0.05 mmと設定した。この σ の値は, 使用した光学式3Dデジタイザ(VIVID 9i)の測定確度の値(TELEレンズ使用, 測定距離0.6 mmの時)である。必要な数値計算はMathematica 5.1(Wolfram Research)を用いて行った。

形状測定装置を用いたUHMWPEカップの摩耗量測定

形状測定: UHMWPEライナーの形状を, 光学式3次元デジタイザVIVID 9i(コニカミノルタセンシング(株))を用いて測定した。測定の際, UHMWPEの光透過性が測定妨げとなるため, 染色浸透探傷剤R-1S(NT)(栄進化学(株))を用いてライナー表面に微小粉末をスプレー塗布し, 光を散乱させる表面状態とした。VIVID 9iと連動する回転テーブルを用いて, ライナーの摺動面や外形の形状を複数回に分けて測定した。測定した表面形状は, 連結した多数の三角形からなるポリゴンデータとして得ることができる。得られた複数の表面形状ポリゴンデータに対し, Rapidform XOR2(INUS Technology, Inc.)を用いて位置合わせと合成を行い, ライナー全体形状のポリゴンデータを作成した。

非摩耗球の推定方法: 次のような仮定(以下, 前提条件と呼ぶ)の元に, 測定したポリゴンデータから非摩耗形状を推定する方法を考案した。

- UHMWPEライナーの摺動面は, 摩耗していない状態では単一の球面(以下, 非摩耗球と呼ぶ)からなる。
- 非摩耗球の中心位置は, ライナーの中心軸上にある。
- ライナー摺動面に摩耗していない部分が残されている。

ライナーの中心軸については, 多くのライナーにおいて, 摺動面以外の部分の形状的特徴から導き出すことができる。本研究の測定例では, 外形の円筒部分から中心軸を算出した(図20)。この中心軸を t 軸とし, t 軸上に中心を置く球 S を考慮してその中心

位置を $C(t)$, 半径を r とする。もし上記の仮定が成

り立つならば, 球 S が非摩耗球と一致していれば,

摺動面の摩耗していない部分の測定データは球 S と

よく重なるはずである。逆に, 中心位置 $C(t)$ と半径 r

を変化させて測定データの一部とよく一致する球を探索すれば, そのときの球 S が非摩耗球である可能性がある。

テストデータを用いた検証: 上記の非摩耗球推定法が機能するかどうかを確認するために, 摩耗したライナー形状を想定したテストデータを作成し, 検証を行った。(図21)

摩耗量の算出: 大阪大学医学部附属病院にて再置換のために抜去されたバイポーラ型人工骨頭に使用されていたUHMWPEライナーを対象として形状測定を行った。非摩耗球推定によって算出された非摩耗

球の中心位置 $C(t)$ と半径 r をもとに, 摩耗したライナーのカップ内側の容積から非摩耗球部分に相当する体積を差し引くことで摩耗体積を算出した。

10. 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

要求仕様

システムの要件: 本システムのねらいは医師がガイドワイヤーを挿入する様子を記録し, 三次元的な広がりをもって空間的な情報を再現できることである。工学系計測が手術中の作業にリスクを与えるようなことはあってはならないため, 手術室において

は手術進行の妨げとならない小型な機器かつ患者に対して非接触な計測である装置の選定が重要である。システムの要件は下記の5つとした。

1) 計測器の設置位置が計測対象に対して適当であり、患者の状態および医師の作業を十分に計測できること。

2) 計測そのものが医師の作業の邪魔にならないこと。

3) 三次元的な位置情報を時系列に取得できること。

4) 挿入操作の時間に対して計測器のもつサンプリングレートが十分であること。

5) 計測範囲が作業領域に対して十分であり、リアリティをもった情報の再現ができること。

計測器の選択：上記要件を満たす計測器として、ステレオカメラ (MiniBEE, Viewplus 社) を選択した。その理由は下記である。

1) 本体のサイズは非常に小さい。手術ナビゲーションシステムによく利用される NDI 社の Polaris Vicra が幅 280mm であるのに対し、View Plus の miniBEE は幅 98mm であり、3分の1のサイズであり、設置が容易である。

2) 一般的なステレオ計測は計測対象にマーカを設置しなければならないが、本計測器はマーカを計測の基準とせず、色の RGB 値の違いで左右をマッチングするため、計測対象にマーカなどの設置を行わずに使用できる。

3) 左右両眼のカメラでカラーでの画像取得を伴って、三次元的な座標値の取得が可能である。

4) フレームレートは最大 15fps であり、デジタルビデオを使う感覚で利用できる。

5) マーカを設置する必要がない分、計測の対象を限られた点とせず、対象の三次元的な表面形状を全体的に計測できる。マーカを設置すれば左右のマッチング精度は高くなる。

よって、miniBEE は手術中の作業の邪魔とならず、患者に対しても非接触の計測ができるので、今回の目的に即していると考えられる。

ステレオカメラの特徴：本計測器は、小型の4眼ステレオカメラである (図25)。小型 (98x31x28mm) の筐体の中に4つ (A, B, C, D) の撮像素子が搭載されている。

計測による三次元座標値の算出にはステレオ法が用いられる。ステレオ法とは左右のカメラ位置から見た視差から距離を算出する方法である。本装置の特徴は、カメラで被写体をうつしたときに左右の同じ点を一致させるアルゴリズムで色の違いを利用しているところにある。そのため、光学式計測器でよく用いられる基準マーカを必要としない。このマーカは左右のカメラから特定の位置を計測するための

ものである。また、ステレオ法は距離によって精度に差があるが、近距離計測用にカメラ A-カメラ D、遠距離計測用にカメラ B-カメラ C を利用する。このように被写体までの距離に応じた計測を行うことで計測精度を向上させている。

機器の配置

手術室での機器の配置イメージ (図26) と今回の実験室環境での配置 (図27)。

A) ステレオカメラ：医師の作業領域が計測できる位置にステレオカメラを設置する。

B) プロジェクタ：計測表面上のコントラストをあげるために作業領域の真上にプロジェクタを設置し、プロジェクタからパターンを投影する。

C) コンピュータ：ステレオカメラを USB ケーブルでコンピュータに接続し、情報の記録を行う。

実験

ステレオカメラによる精度検証：ステレオカメラによる計測の精度検証をするため、次の2種類のファントム、a) 平板、(図28) b) 半球 ($\phi 200$, $\phi 250$, $\phi 300$) (図29) を対象に計測を行う。ここで、皮膚を再現するため対象に肌色のスプレーを塗布したものをを用いることにした。画像上の隣り合う点が異なるコントラストをもつ方が同一点を精度高く特定することができるため、なるべく精細な点がカメラ画像として取得できるのがよい。そこで、パターンをグリッドとし、隣り合う点との濃淡差を高く設定した。(図30)

挿入作業の計測と状況の再現：人体模型を対象とし、ダイレータを挿入する作業をステレオカメラで計測し、三次元座標データにする。

11. 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

試験物質：Tributyltin (IV) chloride：塩化トリブチルスズ

h-CLAT 細胞：THP-1 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。

a) 濃度設定試験

濃度設定試験をおこなうにあたり、V79 コロニーアッセイにおいて、塩化トリブチルスズの IC50 が 10-50 ng/ml の範囲であったことから、その濃度を参考にして DMSO を用いて 500 μ g/ml になるように溶解し、最高濃度の stock solution とした。最高濃度溶液から公比2で8濃度希釈系列で溶媒に希釈して各 stock solution を作製し、その各 stock solution を RPMI-1640 で 250 倍希釈して working solution を作製した。陽性対照である 2,4-Dinitrochlorobenzene

(DNFB, Aldrich) は Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma) に 2 mg/ml になるよう溶解し、stock solution をとした。

平底 96 well プレートに THP-1 細胞浮遊液 2×10^6 cells/ml を 80ul/well で播種し各濃度希釈系列の working solution の 80ul を添加し、CO₂ incubator で 24 時間培養した。

培養後は V 型の 96 well プレートに細胞を移し、700 × g で 3 分遠心して細胞を回収し、FACS buffer (PBS+0.1%BSA) に懸濁した。DB FACSCalibur (Becton Dickinson) での解析の直前に Propidium iodide (PI, 0.625ug/ml) を入れて、PI 染色による生細胞数の測定をした。生存細胞の総数が 5,000 個になるまで測定し、生存率を求めた。

CV75 (生存率 75%) の算出: 濃度設定試験の結果から、生存率 75% の前後の生存率を占める 2 濃度から CV75 を計算した。

本試験: CV75 が 277.5ng/ml であることが算出されたことから、277.5ng/ml を基準に、高濃度側に 1 濃度、低濃度側に 6 濃度公比 1.2 で試験濃度を設定した。stock solution および working solution は濃度設定試験時と同様に調製した。THP-1 細胞は 24 well プレートに 2×10^6 cells/ml を 500ul/well で播種し各濃度希釈系列の working solution の 500ul を添加し、CO₂ incubator で 24 時間培養した。

培養後は 1.5ml チューブに移し、700 × g で 3 分遠心して細胞を回収した後、FACS buffer (PBS+0.1%BSA) に懸濁して 2 回洗浄し 700 × g で 3 分遠心して細胞を回収した。遠心後の細胞を PBS で 0.01% に調製したヒト γ グロブリン溶液 (Sigma-Aldrich, G2388) 600 μ l に懸濁し、4℃ で 15 分間ブロッキングした。反応終了後、180 μ l ずつ 96well プレートに移して三分割し、700 × g で 3 分間遠心して上清を捨てた。回収した細胞を適切な濃度の anti-human CD86 antibody (BD pharmigen: 555657), anti-human CD54 antibody (DAKO: F7143), Mouse IgG1 (DAKO: X0927) をそれぞれ別の well に添加し、4℃ で 30 分間遮光状態で静置した。

FACS buffer を用いて 3 回洗浄後、400ul の FACS buffer に細胞を懸濁し、細胞の表面抗原の発現レベルを DB FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて測定した。死細胞は PI によって染め分け、生存細胞の総数が 10,000 個になるまで測定した。CD86 および CD54 発現の評価方法として、以下の式に基づいた相対蛍光強度 {Relative fluorescence intensity (RFI)} を用いた。

| | | |
|-----------|---|----------|
| RFI (%) = | 添加剤処理細胞の MFI - 添加剤処理細胞の isotype control の MFI | × 100 |
| | Control (溶媒) の MFI - Control (溶媒) isotype control の MFI | |

*MFI = (geometric) mean fluorescence intensity.

陽性基準は CD86 RFI=150, CD54 RFI=200 のいずれか一方を超えたものを陽性と判定する。

LLNA

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 週齢の CBA/JNCrlj female mice は Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) から購入した。マウスは 1 ケージに 4 匹で飼育し、1 週間の馴化後実験に使用した。媒体: アセトンとオリーブ油を 4:1 の比率で混ぜた溶液を媒体として用いた。

陰性対照群 (媒体対照群)、試験物質群 (1 ug/ml, 10 ug/ml, 100ug/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml : 5 用量)、陽性対照群 (0.5% (W/V) 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNFB)) を一セットとして実験を行った。陰性対照、試験物質、陽性対照をそれぞれ 25 μ l ずつマウスの両耳介に 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) を摘出した。各マウスの LCs は個別に 40mM nylon cell strainer (BD Falcon, Billerica, MA, USA) を用いて細胞を懸濁し、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。

12. 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

金蒸着表面への自己組織化膜形成を利用した官能基モデル表面作製とその特性解析を中心に研究を行った。基材は、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。今年度も、昨年度同様、以下に示す 5 種類の官能基試薬を使用して検討を行った。

- 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

昨年度同様、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、モデル表面を調製した。調製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、モデル表面の状態を確認した。

最初に、表面接触角が同程度で異なる 2 種類の官能基をもつモデル表面が細胞分化挙動に与える影響を検討した。調製した各種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 α -MEM (α -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 (β -glycerophosphate、dexamethasone、ascorbic acid) を添加した、あるいは無添加の α -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。

単一官能基が細胞間連絡機能に与える影響を評価する手段としては、Chinese hamster 由来の繊維芽細胞である V79 とその変異体を利用した簡便な手法である代謝協同阻害試験を選択した。この試験は、変異体が代謝できない 6-thioguanine を V79 が代謝して細胞毒性物質を生成し、その物質が細胞間連絡機能により変異体に移動して変異体の生育を妨げることを利用したものである。その機能阻害が生じていると結果的に変異体のコロニー形成が促進されるため、生成コロニー数から阻害程度を推定することができる。この試験で各種モデル表面上での代謝協同阻害率を測定することにより、官能基表面が細胞間連絡機能に与える影響について検討した。

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) スルホン化プレート吸着蛋白質の定性・定量解析 1-1. 二次元電気泳動解析

昨年度実施した二次元電気泳動/DeCyder 解析結果に基づき、ウシ胎児血清蛋白質と比較して含量が 2 倍以上変動しているスルホン化プレート吸着蛋白質を分取用ゲルからピッキングリストに従って 134 スポット分取した。MALDI-TOF/TOF 及び LC-MS/MS 解析を

行った結果、134 スポット中 129 スポットの蛋白質が同定された。多くの蛋白質は血清中に含まれる雑多な成分であったが、TETN (11 スポット: 平均 15.9 倍)、IBP2 (4 スポット: 平均 13.5 倍)、CO1A1 (2 スポット: 平均 5.8 倍)、CO1A2 (1 スポット: 5.6 倍) 等、NH0st の分化促進に関与すると思われる興味ある蛋白質も同定された。

1-2. LC-MS/MS ショットガン解析

LTQ/Orbitrap を使用してスルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析を行った結果、96 種類の蛋白質が同定され、NH0st の分化促進に関与すると思われる増殖因子関連蛋白質 (IGF2、IBP1-4、TGBR3)、骨代謝関連蛋白質 (TETN、MIME、SPP24、VTDB)、細胞接着関連蛋白質 (VASP、HABP2、CO1A2、COMP、FINC)、脂質結合性蛋白質 (FABPL、PEBP1)、Toriose-Phosphate 結合性蛋白質 (TPIS) 等が検出された。

Progenesis LC-MS ソフトウェアにより、ウシ胎児血清蛋白質を対照として含量に関する比較定量解析を行った結果、スルホン化プレート吸着蛋白質では、VASP (451 倍)、FABPL (315 倍)、IGF2 (207 倍)、TPIS (152 倍)、HABP2 (42.3 倍)、TETN (32.3 倍)、PEBP1 (20.6 倍)、CO1A2 (11.2 倍)、COMP (7.72 倍)、IBP2 (1.53 倍) が有意に濃縮されていることが判明した。

(2) 細胞内蛋白質の定性・定量解析

スルホン化プレート上で培養した NH0st の初期段階における細胞挙動変化を追跡するため、24 時間培養後の同細胞から蛋白質を回収してショットガン解析を行った。Reject list を使用して 1DLC 分析を 2 回繰り返した後、2DLC 分析を行って蛋白質の同定を試みた結果、低スコアの蛋白質も全て含めて、1,702 種の蛋白質が検出された。同定された蛋白質の中には Heat shock protein、サイトカイン・ホルモン・成長因子関連蛋白質、骨形成関連蛋白質、アポトーシス関連蛋白質、転写因子を含む細胞サイクル関連蛋白質、細胞外マトリクス関連蛋白質等、NH0st の分化進行に関与していると思われる 207 種の蛋白質が含まれていた。

TMT レポーターイオンを測定することにより、これら 207 種の蛋白質の発現変動解析を行った結果、未処理プレート上で培養した NH0st 由来の細胞内蛋白質発現量と比較して、スルホン化プレート上で培養した NH0st では CH60、ANXA2、CALD1、CTND1、ENPL、XPO1、XPO2、CCNB3、GELS、ITB1、MIF、AT2B4、SEPT9、NEK10、SAPS3、GRP75、TLN1、TAGL、TAGL2、VDAC1 及び VDAC2 の発現量が増加し、CDC37、PA2G4、TGM2、IQGA1、RAB5A 及び 2A5D の発現量は低下する傾向にあることが確認された。

(3) 遺伝子発現解析

Mascot スコアが低く、Peptide confidence も良好でない多くの蛋白質群は検出感度の問題により、蛋白質レベルでの発現変動を確認することができなかった。そこで、平成 19 年度に行った DNA アレイ解析のデータを利用して、207 種の蛋白質をコードする遺伝子の変動状況を再解析した結果、未処理プレート上で培養した NH0st と比較して、スルホン化プレート上で培養した同細胞における発現量が 24 時間以内に 2 倍以上又は 1/2 以下に変動する遺伝子は 38 種類存在した。NH0st の初期分化マーカーである ALPL や骨形成に直接関与する BMP1 のほか、IGF1 の取り込みに関与する EHD2、EGF と相関性を持つ NRD1、EGF レセプターの発現調整に関与する SNX1 の発現量は増加する傾向が認められた。AIFM2、GBP2、IRF6 を初めとした遺伝子群の変動結果から、スルホン化プレート上で培養した NH0st は培養初期におけるアポトーシスが抑制されていることが確認された。また、増殖抑制や分化誘導等に関与する遺伝子である KIAA1524、GSG2、PA2G4、HSP90AA1、PHB、RAB7A、STIP1 の発現量は低下すると共に、細胞増殖、分化、転写調節等の細胞サイクルに関与する ARID2、ITPR3、MAPK8、NEK11、PTPRD、SEPT2 及び SEPT9 の発現量は増加する傾向にあることが判明した。但し、増殖抑制を示す RAB11B 及び BRAB15 の発現量は増加していた (表 1)。

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) NHas は、強い疎水性を示し、水に添加しても、けん濁液を調製できなかった。

DMSO 少量にけん濁した後に、水へ添加すると水中に分散した。

染色体異常試験の結果、構造異常も、数的異常も誘発しなかった。(図 4、図 5)

(2) CNT-1 および CNT-1* は、表面改質処理による影響を調べるために、CNT-1 および CNT-1* を超音波で分散液に調製し、細胞毒性と染色体異常試験を実施した。(図 6、図 7)

(3) CNT-2 は、2 種の分散液を調製し、細胞毒性を比較した。わずかな細胞毒性の違いを認めた。しかし、同様に繊維状の CNT-1 よりも明らかに強い細胞毒性を示した。

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

カルシウム導入量

XRF 分析を用いて、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した各試験材料の

材料表面のカルシウム濃度を測定した (図 8)。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理により試料表面にカルシウムを導入できたが、NaOH + CaCl₂ 処理に比べて、NaOH + Ca(OH)₂ 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 + CaCl₂ 処理ではカルシウムを導入できず、NaOH + Ca(OH)₂ 処理ではカルシウムを導入できた。また、Nb はどちらの処理法でもカルシウムを導入できなかった。

細胞毒性

直接接触法によるコロニー法を用いて、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した各試験材料の細胞毒性を評価した (図 9)。未処理の Ti-6Al-4V は弱い細胞毒性を示したが、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した Ti-6Al-4V の細胞毒性は、いずれもほぼ問題のないレベルであった。その他の試験材料は、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理のいずれにおいても、細胞毒性は認められなかった。試料上に形成したコロニーの大きさにも特段の相違は認められなかった。

骨芽細胞適合性

正常ヒト骨芽細胞用いて、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した各試験材料の骨芽細胞適合性を評価した。

試料の上で 2 週間培養した NH0st 細胞数は未処理の Ti-6Al-4V における細胞数に対する相対値で示した。未処理の Ti-6Al-4V と比べて、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理を施した Ti-6Al-4V ではいずれも細胞数が増加した。その他の試験材料では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理のいずれにおいても細胞数に相違は認められなかった。

試料の上で 2 週間培養した NH0st 細胞の ALP 活性は未処理の Ti-6Al-4V における ALP 活性に対する相対値で示した。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti では、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理及び NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順に、ALP 活性の増加傾向が認められた。その他の試験材料では、未処理の Ti-6Al-4V と比べて ALP 活性が高かったものの、処理の有無による ALP 活性の相違は認められなかった。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

以下の 11 遺伝子について、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 29SNP を選択し、タイピングを行った。

- SERPINE1 (5SNP)

- ・ CYP2C9 (3SNP)
- ・ プロトロンビン (6SNP)
- ・ 凝固因子第 7 (1SNP)
- ・ 凝固因子第 9 (1SNP)
- ・ 凝固因子第 10 (6SNP)
- ・ γ -グルタミルカルボキシラーゼ (1SNP)
- ・ VAMP8 (2SNP)
- ・ TGF β 1 (1SNP)
- ・ TGF β RI (1SNP)
- ・ TGF β RII (2SNP)

人工心臓弁の機能不全が認められる患者 15 名 (全例パンスミスによる機能不全と考えられる。うち 2 例は血栓も併発。) および人工弁の不具合が今のところ認められない患者 11 名由来の DNA を用いた SNP タイピングの結果から、各 SNP のアレル頻度をそれぞれ算出し、表 3 に示した。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すでに得ており、同様に表 3 中に記した。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 \pm 8.1 才) 女性 50 名 (平均年齢 52.4 \pm 8.1 才) である。

健常人 (n=100)、人工心臓弁使用者 (患者; n=26)、機能不全が認められる患者 (n=15)、今のところ機能不全が認められない患者 (n=11) のアレル頻度を示し、健常人 v. s. 患者、人工心臓弁の機能不全有 v. s. 無で有意差検定を行ったところ、健常人 (n=100) と患者 (n=26) との間に 29SNP ともアレル頻度の有意な差は認められなかったが、人工心臓弁の機能不全の有 (n=15) 無 (n=11) の間では、凝固因子第 10: F10 (rs3211736) でアレル頻度に有意な差が認められた (p<0.05)。

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

抜去インプラントの観察: バイポーラ型人工骨頭のアウターカップには、摺動面に傷があるものとリムに傷があるものがあつた。摺動面の傷は抜去時についたものである可能性が高かつた。断定が難しい場合もあつたが、いずれにしても相手面の摩耗を促進すると思われるような大きな傷は見られなかつた。一方、リム付近の傷は、インピンジのため繰り返し接触した痕跡と思われた。リムに傷が確認できた症

例では、リムの全周で傷が観察されたものが多く、アウターカップが回旋していたものと考えられた。

UHMWPE ライナーでは、破損が確認された症例が 5 例中 2 例あつた。また、別の 1 例では、骨頭を固定するためのリングにき裂が観察された。バイポーラ型人工骨頭では、骨頭を UHMWPE ライナー内部に保持しておく機構が必要である。この部分の設計は各製品で異なっていたが、破損やき裂はいずれの場合もこの部分で生じていた。破損が生じていない 2 例では、この部分の厚さが 10mm 以上と、他の製品に比べ大きかつた。

骨頭は 2 例のみで入手可能であつたが、いずれも傷などは観察されなかつた。

UHMWPE コンポーネントの FTIR による分析: 各 UHMWPE コンポーネントの平均のトランスビニレン指数は、OUH009 では 0 であつたのに対し、その他 4 例では 0.015~0.020 であつた。この値から推定されるガンマ線照射量は 40~55kGy であつた。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 25~40kGy に比べやや高い傾向があるが、トランスビニレン指数はフリーラジカルの再結合により埋植期間中に若干の上昇の可能性があること、高度架橋ポリエチレンの照射線量である約 100kGy に比べると低いこと、および推定される埋植時期を考慮すると、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。

各 UHMWPE コンポーネントの結晶化度は、OUH009 では 64% であつたのに対し、その他の試料では 70% 以上の高い値を示していた。

各 UHMWPE コンポーネントにおける最大酸化度は、OUH009 では 0.60 であつたのに対し、その他の試料では 4.0~6.9 の間に分布していた。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。酸化度が低かつた OUH009 では目視観察で明らかな破損などが見られなかつたのに対し、酸化度が高かつた OUH006~OUH008 では、破損やデラミネーションなどが観察された (図 1 1~図 1 6)。ただし、OUH010 は、酸化度が高かつたにもかかわらず、破損やデラミネーションが見られなかつた。

摩耗量測定: 摩耗量測定結果、最大摩耗量は 520mm³ と推定された。一方、摩耗量が負と推定された症例もあり、誤差の影響が考えられた (表 5)。

診療情報との照合および総合分析:

(1) OUH006

46 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。10.2 年経過して、バイポーラカップの中心性移動のため、再置換となつ

た。

入手可能であったのはUHMWPEライナーだけであった(図11、図12、図13)。リム部が全周にわたって破断していた。かなりデラミネーションが進行しており、生体内で破断していたと考えられた。骨頭はUHMWPE製C型リングにより固定する構造であったが、このリングにもデラミネーションが見られ、酸化劣化の進行が示唆された。UHMWPEライナーを詳細に観察(図13)すると、ライナーの厚みが1mm程度薄くなっている方向があり、この方向に摩耗がかなり進行したものと思われた。摩耗量測定の結果も 520mm^3 と、大きな摩耗量が推定された。

FTIR測定の結果は、ガンマ線照射あり(43kGy)、結晶化度70%、最大酸化度5.9であり、空気中でガンマ線照射滅菌が行われ、酸化劣化が進行したものと思われた(表4)。

インプラントの分析から、以下のように推定された。空気中におけるガンマ線照射滅菌のため酸化劣化が進行していた。摺動面での摩耗も 520mm^3 と相当量発生していた(表5)。また、継続的なリムにおけるインピンジメントの発生のため、リム部のデラミネーションが進行した。この症例の場合は、アウターカップの回旋が正常に機能していたため、リム全周にわたってデラミネーションが発生した。

摺動部の摩耗やリムでの広範囲にわたるデラミネーションの発生により、多量の摩耗粉が発生したことが予想され、骨溶解にいたる生体反応が生じたことが想像され、これによる寛骨臼側の骨溶解が人工骨頭の中心性移動に寄与した可能性が示唆された。

(2) OUH007

47歳女性、大腿骨頭壊死症(ON)のため、バイポーラ型人工骨頭置換術を施行。20.5年経過して、バイポーラカップの中心性移動のため、再置換となった。

アウターヘッドに目立った傷は見られなかった。UHMWPEライナーは全体的に褐色に変色していた。リム部には全周にわたってデラミネーションが発生していた(図14)。摺動面には光沢があり、摩耗の進行が示唆された。しかし、摩耗量測定の結果は -28mm^3 と、摩耗量を検出しなかった。UHMWPEライナーは骨頭をUHMWPE製リングで保持する機構になっていたが、このリングも変色しており、また、多数のクラックが認められた。

FTIR測定の結果は、ガンマ線照射あり(43kGy)、結晶化度71%、最大酸化度4.0であり、空気中でガンマ線照射滅菌が行われ、酸化劣化が進行したものと思われた。

インプラントの分析から、以下のように推定された。空気中におけるガンマ線照射滅菌のため酸化劣

化が進行していた。形状測定からは摩耗量が検出されなかったが、アウターカップの回旋のため摺動面の摩耗が全方向に進行し、非摩耗面が存在しなかった可能性も考えられた。一方で、継続的なリムにおけるインピンジメントの発生のため、リム部のデラミネーションが進行した。この症例の場合は、アウターカップの回旋が正常に機能していたため、リム全周にわたってデラミネーションが発生した(図15)。

広範囲にわたるデラミネーションの発生により、リムでの多量の摩耗粉が発生したことが予想され、骨溶解にいたる生体反応が生じたことが想像され、寛骨臼側の骨溶解が人工骨頭の中心性移動に寄与した可能性が示唆された。

(3) OUH008

29歳女性、大腿骨頭壊死症(ON)のため、バイポーラ型人工骨頭置換術を施行。20.5年経過して、バイポーラカップ脱転による疼痛のため、再置換となった。

このインプラントは、UHMWPEライナーのリム近傍に6つの切れ込みを入れ6本のつめを作り、骨頭を保持する機構であった。これら6本のつめに便宜上、1~6の番号を図16のようにつけた。6本のつめのうち、つめ2~5の4本が破断していた。また、つめ1にもき裂が入っており、破断にいたる途中で抜去されたものと思われた。つめの基部外側には切れ込みがあり、骨頭を挿入する際につめが外側に広がるようになっているものと思われたが、その結果、その部分の肉厚が減少しており、破断はその近傍から発生していた。リムにはデラミネーションが観察された。特につめ4、5でデラミネーションが激しく、表面部分が完全に失われていた。つめ2の方向に摩耗が進行しており、肉厚の減少が肉眼でも確認できた。また、つめ1と2の間の方向で摺動面がえぐれたようになっていた。摩耗量測定の結果は 59mm^3 と推定された。

アウターヘッドの摺動面では、リム近傍の抜去のためのものと思われる傷を除いては、目立った傷は見られなかった。リム側ではつめ4、5の方向でつや消し仕上げが消失し、光沢が出ている部分(図16、杵部分)が確認され、この部分でのインピンジが示唆された。一部では内側の角が摩耗により削り取られており、かなりの長期にわたり繰り返しインピンジが発生していたものと思われた。アウターヘッドのインピンジの跡の部分と、UHMWPEライナーのリムのデラミネーションが最も激しかった部分が一致しており、インピンジによりデラミネーションが進行したものと思われた。また、その対面側で摺動面がえぐられており、インピンジによるこの原理でこ