

2009 40013B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医療機器・医用材料の
リスクアセスメント手法開発に関する研究

平成19年度 ～ 21年度

総合研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成22(2010)年 4月

目次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

総合研究報告書

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

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、13項目からなる課題に取り組み、以下の成果を得た。

1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

本研究では、ヒト正常骨芽細胞 (NHOst) に対する分化促進機能を示すスルホン化プレートモデル材料として、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。その結果、スルホン化プレートが示す NHOst の分化促進機能とプロテオミクス解析結果の間には密接な相関性が認められた。プロテオミクス解析は医用材料の機能や生体適合性を評価する新しい手法として非常に有益であることが示された。

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

二酸化チタン、フラーレン、ポリスチレン (PS)、カーボンナノホーン、カーボンナノチューブを扱い、分散法としてメノウ乳鉢による粉碎、卓上型超音波洗浄機、投入型超音波発生装置の使用を試みた。材料の分散液調製において、強い疎水性のカーボンナノホーンを液中に取り込むことはできなかったが、ジメチルスルホキシドに懸濁後、培地に入れると容易に液中に取り込むことができた。液中での粒子径を小さくする手段としては、投入型超音波発生装置が効果的であった。一方、細胞毒性、染色体異常を評価する試験法としては、既存の試験法をスクリーニングとして応用可能であった。サイズ標準 PS 粒子を用いた実験で、特定のサイズの粒子が特に強い細胞毒性を示したことから、ナノマテリアルも凝集体として μm サイズで存在する時に強い毒性を示す可能性が考えられる。ナノマテリアルのヒトへの安全性評価という観点からは、ナノサイズの粒子からなる分散液の試験と同様に、「あり姿」としての凝集体の試験も必要ではないかと考えられる。いずれの場合も、安全性評価時には、試験した分散液の分散状態を示すデータ (例：粒子径分布) も考慮に入れる必要があることが強く示唆された。

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

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。フーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) を用いて、擬似体液浸漬による材料のアパタイト形成能を定量的に評価することができた。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、NaOH 処理、NaOH + CaCl_2 処理、NaOH + Ca(OH)_2 処理の順にアパタイト形成能が高くなった。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb 及び Ti は、未処理、NaOH 処理、NaOH + CaCl_2 処理及び NaOH + Ca(OH)_2 処理の順に、骨芽細胞の分化レベルを増加させた。NaOH + Ca(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

心臓弁膜症の治療として人工心臓弁を体に埋植した際の機能不全の主な原因と考えられる血栓形成やパルス形成について、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。対照として、日本人の健常人由来の DNA として 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 DNA100 検体を用いて検討した。ターゲットとした遺伝子は、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの薬効関連遺伝子や生体における炎症反応などに関連する遺伝子など 11 遺伝子で、日本人ですでに報告のあるものを中心に計 29SNPs

を選択した。その結果、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、この SNP (rs3211736) が人工心臓弁の機能不全の発症に関与する可能性が示唆された。

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

人工関節置換術は QOL の大幅な改善が期待される有用な治療法であり、毎年症例数も増加している。しかし、不具合により再置換術が必要になることも少なくない。生体外における工学的試験や臨床試験から不具合の要因を解明することは困難であることから、不具合により摘出された抜去インプラントの解析を行い、そこから不具合の要因を推定することが最も有効である。また、インプラント以外に起因する不具合も多いため、診療情報を含めた総合的な判断によりこれを除外することが必要である。また、一般的に医療機器の技術進歩は早く、毎年のように新しい技術が導入される。一方で、埋植医療機器は使用期間が長く、抜去インプラントの不具合要因は、既に克服された既知の要因によるものであることも少なくない。そのため、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。10 例の不具合要因解析を行い、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。また、インプラントと生体の間の界面に関連する問題も多いことがわかった。不具合の要因は技術の進歩に伴い変化することから、継続的な調査が必要であると考えられた。インプラントに起因する不具合は、摺動面に使用される超高分子量ポリエチレン部品の摩耗や疲労がその要因になることが多いが、摩耗については研究が進み対策も進んでおり、今後はこれにかわり疲労の問題が顕在化する可能性が考えられる。しかし、抜去インプラントに適用可能な超高分子量ポリエチレンの疲労特性評価法がないため、疲労特性と不具合の関連については不明なことが多い。そこで、抜去インプラントの超高分子量ポリエチレン部品の疲労特性を評価する方法を検討した。

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

本研究では、人工膝関節のリスクアセスメントを目的として、膝関節にとって力学的に最も厳しい動作状態のひとつであるしゃがみ込み等の深屈曲動作を再現するためのコンピュータ・シミュレーションモデルを開発し、人工膝関節のリスクアセスメントに応用した。開発したモデルは、非線形ばねモデルを利用した簡易モデル、膝関節の実構造を考慮した人工関節置換膝モデル、実験利用される膝シミュレータを数値モデル化したバーチャル・シミュレータモデルの 3 種類である。現行の人工関節を解析した結果、動作過程での応力の推移の可視化、損傷や摩耗の原因となる応力集中箇所の特長、機種間の安全性の比較等を効果的に行えることが示された。

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

頭蓋内ステントは、脳動脈瘤への血管内治療において、コイル、液体塞栓材料に続いて 3 番目のインプラントとして、注目を浴びている。特に、前者 2 つの手法の適用が困難なワイドネックの瘤等への適用が有望視されている。さらに、脳動脈瘤内の血流を阻害することを目的とした血流阻害能力を付与した「脳動脈瘤用ステント」も市場に出てきた。以上のようにこの 3 年だけを見てもデバイス開発は急速に進んでいる。しかしながら、ステントの血流阻害能力はまだ明確ではなく、各社はステントの材料自体を増やし、細かいストラットをメッシュのように使用しているものも登場している。これらのステントは、しかしながら、動脈瘤内の血流を完全に阻害しているのではないため、瘤の再開通や親血管の塞栓などが起きている。これらの原因は本ステントに対するリスクアセスメントが世界的に見ても存在しないことにあると考えられ、本ステントのリスクアセスメントの構築は、非常に重要なテーマである。本研究では、脳動脈瘤用ステントの血流阻害能力をコンピュータシミュレーションで計算する手法を研究開発と阻害能力の理論構築に対する研究を行ってきた。シミュレーションするには、直径 100 μm 前後の非常に細かなストラットの 3 次元形状を正確にコンピュータ上に再構築なされなければならない。また、ストラットの血流阻害能力について一定の理論構築がなされなければ、リスクアセスメントに非常に時間がかかる。3 年間の研究開発の結果、ステント形状を正確にコンピュータに取

り込み、世界でもトップレベルのシミュレーション技術を開発した。また、ストラットの位置による血流阻害程度も分かってきたので、ここに報告する。

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

人工股関節や冠動脈ステント、および骨固定プレートについて、形状測定装置を用いて形状を測定した上でコンピューターシミュレーション（有限要素解析）や数値処理を行うことにより、破損リスク評価や不具合要因分析を行う手法について研究を行った。人工股関節ステムや骨固定プレートを形状計測し、有限要素解析に応用可能な形状データを作成した。特に骨固定プレートについて、手術時の変形操作を考慮した弾塑性有限要素解析を行い、塑性ひずみ分布・残留応力分布を得た。その結果より、手術時の変形操作によって強度が大きく低下する可能性があることが推測された。また、抜去された人工股関節の UHMWPE ライナーを形状計測して得た形状データから、その摩耗状態の分析を行うための数値処理手法、特に測定形状から摩耗前の形状を推定する計算手法について研究を行った。この計算手法により、より客観的な摩耗状態の評価が可能と考える。

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

医療機器のリスクアセスメントのために、工学的なシステムとして構築した系で治療手技を再現することで、臨床での経験を定量化する手法の開発を行う。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。実験室系での臨床利用状況の評価（平成 20 年度）と臨床利用中の情報取得のためのシステム開発（平成 21 年度）という双方向からのアプローチにより、リスクアセスメント手法を提案した。

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

近年、動物代替試験が推奨され、*in vitro* での評価法の開発が急務であるが、医療機器および医用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、主に生分解性バイオマテリアルであるポリマーを対象として *in vitro* の皮膚感作性の評価法である human Cell Line Activation Test (h-CLAT) h-CLAT と *in vivo* 評価法の Local Lymph Node Assay (LLNA) の間で相関性について検証した。その結果、両者の結果に相関がある傾向がみられ h-CLAT は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の *in vitro* の評価法として使用できる可能性が示唆された。

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てきた。炎症系細胞を用いての解析を試みてきたものの、適切な実験系を構築することは困難であった。一方、平行して行ってきた分化細胞とモデル表面材料との相互作用解析を通して、物理化学的及び化学的表面特性とのバランスが様々な細胞挙動を制御する上で重要となることが明らかとなった。

13. 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

米国の医療機器不具合報告データを入手し、機器の種類、不具合ごとに分類し、時系列に追うことで、不具合の傾向を掴んだ。糖尿病検査・治療関連の報告が非常に多いことや、心臓血管系の不具合が多いことが分かった。特に、電気関連の不具合、薬物放出型冠動脈ステントでの閉塞に注意を払うべきと思われた。不具合の傾向としては、製品に問題があるとされた報告や Adverse Event を生じた事例に焦点を置いて解析した。結果、埋め込み型除細動器・ペースメーカー関連の電气的不具合、薬物溶出型冠動脈ステントでの閉塞、人工膝・股関節での摩耗・ゆるみ、人工股関節での脱臼、近年の埋め込み型注入器・止血機器・埋め込み型脊髄刺激装置の報告増加、などに最も注意を払うべきと思われた。

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
- 佐藤道夫 国立医薬品食品衛生研究所
療品部 研究員

A. 研究目的

1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。これは、医用材料が細胞や組織のような

生きた生体システムと接触し、その界面で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。細胞は材料表面上で構造変化した吸着蛋白質を介して材料に接着することにより、最終的な生体反応を誘導する。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。そこで本研究では、近年、機能性材料の1つとして注目されているスルホン化材料の作用機序を分子レベルで解明することを通じて、プロテオミクス解析が医用材料のリスクアセスメント手法として利用できるか評価した。

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

本研究では、比較的簡便な方法で、ナノマテリアルの遺伝毒性のリスクを測定できる手法を開発する。具体的には、ナノマテリアルの染色体異常等をスクリーニングできる手法を提案することを目的とした。

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

骨系埋植医療機器の埋植初期に見られる不具合は、機器と骨との接着不足が原因であるとされており、埋植早期に生体骨と強く結合するような性質を付与した材料が開発されている。骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。そして、擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる。そこで、FT-IR/PAS法を用いて、擬似体液中でのアパタイト形成能を定量的に評価する方法を確立する。さらに、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与する方法を検討するとともに、アパタイト形成能を付与したチタン合金の生物学的安全性を評価する。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

心臓弁膜症は、心臓病の大きな原因の一つであり、人工心臓弁置換手術による治療が行われている。現在、臨床的に用いられている人工弁は、大きく分けて機械弁と異種生体弁があり、どちらもそれぞれの特徴に一長一短はあるが、遠隔成績からは生存率に差はない。世界でインプラントされている弁は約60%が機械弁であるといわれている一方で、わが国における人工弁の利用は一説では約80%が機械弁であるとも言われ米国等に比べて多い。機械弁の機能

不全の主な原因としては、血栓形成とパンヌス（心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織）形成が挙げられている。大動脈弁の置換術後における人工弁機能不全は、患者の生命を危機に曝す重大な問題である。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために置換手術後は生涯にわたり抗血液凝固薬及び抗血小板凝集薬服用が必要となるが、薬の作用には個人差もあり血栓が形成された場合には急速な人工心臓弁機能不全を招く恐れがある。また、パンヌスの形成についてはそのメカニズムは未だ明らかにされておらず、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。

本研究では、人工心臓弁（機械弁）を体に埋植した際の血栓やパンヌスの形成の原因となり得る遺伝子多型を探索することを目的とした。血栓形成に対する抗血液凝固療法については、日本人は欧米人と比較すると弱い抗凝固療法でも有効である事がわかっており、わが国のガイドラインは欧米に比べるとやや緩めに設定されているようにその感受性に人種差があると考えられている。抗凝固療法の基本的薬剤であるワーファリンの使用量に関する日本人の遺伝子多型の研究はこれまでも数多くなされているが、心臓弁膜症手術における抗凝固療法に関する遺伝子多型の検討報告はほとんどなされていない。また、人工心臓弁機能不全のもう一つの原因と考えられるパンヌス形成に関してはその形成メカニズム自体が不明である。そのため、本研究において日本人の機械弁使用者における機能不全につながる血栓やパンヌ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。

本研究では、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血栓やパンヌス形成の原因となり得る遺伝子多型を探索するために SNP タイピングを行い、両者を比較検討した。また、対照として、日本人の健常人由来の DNA として 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 を用いて検討した。さらに、今回ターゲットとした SNP に加え、ワーファリン使用量の決定因子に関わる遺伝子多型について特に日本人における報告を中心に調査し、新たなターゲットの探索も行った。

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

人工関節置換術は変形性関節症や関節リウマチの患者で、疼痛などの理由により歩行や起立が困難になるなどの場合に行われる。歩行が可能になるなど生活の質（QOL）が改善されることから、一般的に広く普及した治療法であり、本邦では年間約 15 万例が行われており、毎年着実に増加している。

一方で、不具合により抜去される事例も増加している。重篤な不具合が発生した場合は再置換術を行うが、初回の手術に比べ困難な手術となり、成功率も低下すると言われていた。また、患者やその家族にとっては、手術による身体的負担や、長期の入院による経済的、社会的負担が生じ、社会全体としても医療費などの負担が生じることになる。従って、再置換の原因を分析し、再置換の必要のない、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。大きく分類すると、設置位置不良など手術手技に起因するもの、合併症や転倒事故による骨折など患者に起因するもの、そして、インプラントに起因するものに分けられる。従って、抜去インプラントの分析に加え診療情報の分析も行い、総合的に判断する必要がある。

また、人工関節の抜去インプラント解析では、タイムラグについて常に念頭に置いておく必要がある。人工関節は長期にわたり使用されるため、入手できるインプラントは製造されてから 10 年以上の期間が経過していることが少なくない。特に、インプラントに起因する不具合は後年になって生じることが多い。例えば人工股関節では、摺動面に使用される超高分子量ポリエチレン（Ultra-high molecular weight polyethylene、以下、「UHMWPE」とする）の摩耗の問題により再置換にいたる症例が、現在は比較的多い。しかし、滅菌方法の改善（UHMWPE の劣化の遠因となる空気中でのガンマ線照射滅菌の中止）や耐摩耗性を向上させた新材料（高度架橋ポリエチレン）の導入などが行われ、これらの技術革新により、近年埋植されたものや今後埋植されるものでは、UHMWPE の劣化や摩耗に起因する不具合の発生は減少することが期待される。しかし、現在入手可能な抜去インプラントは、これらの要因により不具合に至ったものが多くあることが予想される。従って、不具合要因を総合的に分析し、再置換の直接の原因となった要因を探るだけでなく、今後減少が予想される要因を除き、今後増加が見込まれる要因を探り出すことが必要である。ただし、過去には実験室レベルでは好成績であったものが臨床では不具合が多く発生した事例があり、新しい技術が臨床でも期待通りの性能を発揮するか、予期しない別の新しい問題を生じないか、注

視する必要がある。

以上のように、人工関節の不具合要因は多様であり、また、技術の進歩により刻々と変化することが考えられる。本研究では、新しい人工関節の開発や審査へフィードバックすることを念頭に、最新の抜去インプラントを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。

インプラントに起因するものとしては、部品の摩耗や疲労といった、耐久性が問題になることが多いが、前述のように摩耗に起因する不具合が減少した場合、これに替わり疲労の問題が顕在化する可能性が考えられる。人工関節用 UHMWPE の疲労特性の評価は compact tensile (CT) 試験片を使用した疲労き裂成長試験によるものが多い。しかし、CT 試験片の作製に必要な寸法による制限により抜去インプラントへの適用は難しい。そのため、疲労特性の低下と実際の不具合との関連性については不明なことが多い。そこで、抜去インプラントに適応可能な疲労特性評価法について検討した。

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

近年、開発された脳外科手術時に使用される合成生体吸収性人工硬膜は、感染、再手術などのリスクを避けられる。しかし、吸収性人工硬膜の素材として用いられるポリ(乳酸、グリコール酸、カプロラクトン等)共重合体(PLGC)膜の重合に触媒としてジブチルスズ(DBT)やオクチル酸スズ(2-エチルヘキサノ酸スズ)(OT)の混合物が使われ人工硬膜に残存する。これらPLGC及び残存物質が頭蓋内で溶け出したときに、どのような影響が起ころうかは不明である。例えばDBTは強い細胞毒性、特に免疫系に強い毒性を示し、マクロファージ系細胞に関しては低濃度で強い毒性を示す(Tsunoda, et al., 2006, 2008)。適切な実験モデルを用いPLGC膜の安全性を評価する手法が求められている。

本研究に先立って、我々はモデルとして、PLGC膜を作製し、ラットに脳外科手術を行い、頭蓋内にDBTやOT濃度が異なるPLGC膜を埋め込み、一ヶ月の観察期間終了後、代表的な行動学試験で特にスクリーニングに使用される、オープンフィールド試験と prepulse inhibition (PPI) testで評価を行ってきた。オープンフィールド試験は主に移所運動活性を測定し、あわせて一般適応行動変化を捉える(高田、1990)。PPI testは聴性驚愕反応を用いた試験法で、認知機能、学習機能を測定する(Inada, et al. 2003, Kobayashi et al. 2004)。また神経毒性の指標として頻用される、脳各部位の神経伝達物質及びそれらの代謝産物の定量でも評価を行ってきた。

先行研究で埋め込みのための、くり抜く頭蓋骨直径を直径5mmに設定したところ、脳表面の損傷は殆ど

なかったが、頭蓋骨の再生のスピードが速く、殆どの例で膜が頭蓋骨にサンドイッチ状に挟まれ、骨内に多く埋没していたために、モデルとして問題があった。くり抜きの直径をラットの頭蓋から見て、殆ど限界である1cmに設定した場合は、1ヶ月後の観察では膜が骨に埋没しているケースはほとんどなかったが、脳表面の損傷が強く、壊死している個体もあった。そこで頭蓋骨くり抜きの直径を中間の8mmに設定することとした。

一方、PLGCを37℃の生理食塩水に漬け溶出を検討した実験では1ヶ月を過ぎた時点から溶出の速度が上がる。また実際の臨床応用でも、膜が吸収されるまでは長期を要する。安全性評価のモデルとしては、1ヶ月より長い期間が望ましいため、2ヶ月の観察期間を設定し、1ヶ月と比較する必要があると考えた。

また、より現実に近いモデルを確立するためには、脳の損傷、特に感染による損傷はなるべく少なくすることが望ましい。実際の外科手術においては、術後に抗生物質の投与が行われている。現実に近い手段を講じたモデル、つまり抗生物質投与を行うモデルが望ましいと考えた。

そこで、今回の研究では、頭蓋骨くり抜き直径を8mmに設定してPLGC膜を埋め込み、観察期間を1ヶ月または2ヶ月に設定し、行動学試験で評価を行い(2ヶ月に関しては抗生物質投与の措置を講じ、行動学試験及び神経伝達物質定量)、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

高齢化社会の到来に伴い、変形性関節症や関節リウマチなどの膝関節障害により歩行さえも出来ない人々が増大している。重度の場合には、人工膝関節置換術を施すことで膝の運動機能は大幅に回復し、通常の歩行はもちろんのこと、軽度の運動までもが可能となる。しかし、長年の使用により特に超高分子量ポリエチレン製の脛骨インサートの損傷や摩耗が問題となっており、現行機種のリスクアセスメント及び新機種の開発においても脛骨インサートの耐久性等の評価が重要となってきた。

本研究では、コンピュータシミュレーション技術を応用して、複雑な3次元形状を有する人工膝関節が実際の動作状態においてどのような応力状態にあるのかを高精度で把握し、リスクアセスメントを可能とする数値解析手法を開発することを目的とした。

具体的には、まず人工膝関節のCADデータを簡易化したモデルと非線形バネモデルを組み合わせることで構築した簡易解析モデルを用いた深屈曲解析法を開発した。次に、CT画像とMRI画像を基に骨と軟組織を考慮した詳細な3次元生体膝モデルを構築し、

人工膝関節を置換したモデルへと発展させ、歩行動作や屈曲動作の解析を可能とする解析法を開発した。第3のモデルとして、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開発を試みた。

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

1) 脳動脈瘤

脳動脈瘤の破裂は人々のそれまでの健康な暮らしを一変してしまう可能性があり、破裂前もしくは破裂直後の治療が大変重要である。脳動脈瘤とは脳の動脈の一部が膨らんでこぶ状に発達した血管疾患の一つである(図16)。脳動脈瘤は周りの神経などを圧迫することにより症状を起こすことがあるが、ほとんどの場合は瘤の壁が破れて出血を起こすことで発症する。出血を起こすと、その血液が脳の表面に広がりくも膜下出血を引き起こす。くも膜下出血を発症後死亡する率は、病院に収容され治療が開始される前に死亡する突然死、入院後に死亡する重症例を含め約50%近くにのぼる。このくも膜下出血の主要な原因である未破裂脳動脈瘤は、成人の2~3%が保有していると考えられており、その大きさによって破裂する率が異なるものの、我が国の平成20年度のくも膜下出血による死亡者数は1万4千人を超えた。破裂を起こす脳動脈瘤の発生部位には偏りがあり、特に頭蓋底動脈瘤、椎骨脳底動脈、後大脳動脈、後交通動脈で起こる傾向にある。これまで脳動脈瘤の発生、成長、破裂に至る要因として、特に脳動脈瘤内の血流パターンやShear stressなどの流体力学的要素の関連が指摘されている。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。

2) 脳血管内治療

脳血管内治療とは鼠径部よりカテーテルを頭蓋内血管まで挿入し、透視像を見ながら血管内部から脳血管障害を開頭手術なしに治療をする新しい分野である。この利点として、従来の開頭手術と比べると患者への負担が少なく、全身状態の悪い症例や高齢者も治療対象に治療できる。治療時間も開頭手術と比較して短時間で可能なことが多い。治療後の入院期間も短く、早期社会復帰が可能である。といった点が挙げられる。現在のところ主に脳動脈瘤の治療にはクリッピングと呼ばれる外科手術とコイル塞栓術と呼ばれる血管内治療が行われている。クリッピ

ングとは瘤の付け根をクリップで挟んで瘤内へ流入する血流を遮断することによって破裂を防ぐものである。またコイル塞栓術とはコイルと呼ばれる金属製の紐状のものを瘤内に詰め瘤内の血流速度を減少させることによって壁せん断応力を小さくすることに加え、瘤内に血栓を形成させることによって塞栓させるものである。特にコイル塞栓術はヨーロッパでは脳動脈瘤の治療の7割以上に用いられており、また米国では約半数に用いられている。その一方で日本では約2割に留まっている。これは欧米に比べて血管内治療ができる医師が少ないこと、血管内治療に用いる新しい機材が少ないことなどによる。また近年では、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。現在この手法は発展を続け、特にネックの広い瘤に対して次第に検討されるようになってきている。

3) 近年の脳動脈瘤用ステント

血管内治療は、低侵襲で患者に対する負担も少ないことから、近年高く注目されている。この治療法に対する機械工学的な主な理論的見解は、デバイスによって脳動脈瘤内への血流を遮断もしくは減少させることである。ステントは従来血管拡張を目的に留置をされてきたが、Aneisら(J. Biomech. Eng., 1997)は、理想的な脳動脈瘤形状を用いた数値流体解析を行い、ステントのみによって脳動脈瘤内の血流の速さが低下する可能性があることを示唆した。その後、Baráthら(Neurol. Res., 2005)は、in-vitroの理想的動脈瘤モデルにステントを留置し循環装置につなぎ、ステントによる瘤内の血流速度の低下を測定した。これらの結果より、これまでコイルが不適用なワイドネックな脳動脈瘤に対して、ステントのみを留置することによって脳動脈瘤内の血流を低下させ治療に用いられる可能性が示唆された。

現在のステントは、ニューロフォームの第一世代をすぎ、シルクステントやパイプラインと言ったストラットの半径が小さなもの、つまり網目が細かいものが主流となってきている(図17)。しかしながら、親血管が塞栓するなどの結果もでており、抜本的な解決とは至っていない。これは、ステントの血流阻害に関する評価機構がいまだ存在しないことに起因

すると考えられる。

そこで、本研究では、血流障害能力を流体力学的に定量化する手法を開発するため、ストラット形状の定量化技術、ファインストラットでの離散化技術、ストラットの血流障害の理論的構築を行ったので、報告する。

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、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

力学的な支持を目的として体内に埋植されて使用される医療機器は、その機械的な設計が成績に影響する。近年、このような医療機器の設計評価を行う際、計算機シミュレーション、特に有限要素法が開発・研究において盛んに利用されている。これは、有限要素法が、実際の使用に近い形で力学的な状態を再現できる特徴を有しているためである。その一方、有限要素法による解析を行うためには、その機器の設計に関する情報（形状、材質等）が必要になるが、それらの情報を製造者から得ることは一般的に難しい。そこで、本研究では、人工関節や冠動脈ステント、さらに骨固定プレートについて、実際の製品の形状計測を行って形状に関する情報を抽出し、それを元にした有限要素解析から製品のリスク分析を行うことを目指して研究を行った。

また、この形状計測手法を応用して、抜去された人工股関節の摩耗状態を分析する技術についても研究を行った。人工関節の摺動面に用いられている超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）の摩耗粉は、人工関節のゆるみを引き起こす等の悪影響が知られている。そのため、人工関節の不具合要因を分析する上で、その摩耗状態を調査することも必要になる。本研究のように抜去品の形状測定を行った結果から摩耗状態を分析する従来の研究では、摩耗前の形状が不明であることが問題点であった。そこで本研究では、この摩耗前形状を形状測定データから推測するための数値処理手法の考案を行った。

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

カテーテルやガイドワイヤーの不具合について、「医療機器等不具合報告」（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、それにはその原因を知ることが先決である。本研究の目的は、臨床における手技を評価する指標を抽出することで問題点を発掘し、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。

【平成 20 年度】カテーテル手技の際にデバイスを臨

床利用する状況を工学的な試験系によって模擬する評価法を開発し、患者に安全に使用する環境の提示を試みた。

【平成 21 年度】カテーテル手技中の状況を予め計測、記録できるようにし、ガイドワイヤーおよびカテーテルの挿入時の問題点を抽出するためのシステムの開発を行った。

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

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* 皮膚感作性評価法である。我々はこの方法を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用出来るかを検討するため、医用材料として使用される生分解性バイオマテリアルであるポリマー、およびポリマー合成の際、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を対象として h-CLAT で評価できるかの検討をおこなった。さらに *in vivo* 評価法の Local Lymph Node Assay (LLNA) の間で相関があるかの検証を行い、両者の結果を比較検討したので報告する。

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

医療機器によって生じる埋植後の生体反応では、材料及びその溶出物による毒性に加えて、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用も要因の 1 つとなる。そこで、表面特性の異なる種々の医用材料上での細胞挙動変化により材料・細胞間相互作用解析を行い、埋植後の生体反応とその医療機器表面との関連性を従来とは異なる視点で詳細に検討することを目的として本研究を行っている。また、表面特性が細胞の挙動変化に与える影響を詳細に解明することで、今までよりも信頼性の高い医用材料の炎症リスク *in vitro* 評価技術の開発に繋がることを期待される。本研究では、自己組織化膜を利用して種々の表面特性をもつモデル表面の作製を行うとともに、各種細胞をその表面上で培養してその接着、増殖、分化及び細胞機能変化を検討した。また、その結果を基に、材料が実際に生体内に埋植された後に生じる生体反応との関連性について考察を行った。

13. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発

医療機器のリスクアセスメント手法の一環として、医療機器の不具合データを解析することにより、医療機器の不具合リスクとその傾向を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

スルホン化プレートは、細胞培養用シャーレ (ϕ 90 mm)、トレイ (22.5 x 22.5 cm) 又は 24 ウェルプレートに濃硫酸を分注し、37°Cで種々の時間インキュベートした後、洗浄・乾燥して作製した。XPS 解析と静的接触角の測定は、それぞれ島津製 ESCA-3200 及び ERMA 接触角測定器 G-1-1000 を使用して行った。NH0st の培養は 5 mM β -グリセロリン酸ナトリウム、10 nM デキサメタゾン及び 10% 牛胎児血清を含有する α -MEM 培地を用いて行った。同細胞の増殖度、ALP 活性及び Ca 産生量は、それぞれ TetraColor ONE、パラニトロフェニルリン酸を基質とした比色法及びカルシウム C-テストワコーを用いて定量した。画像解析は、ホルマリン固定した細胞をヘキスト 33258 (細胞核)、rhodamine phalloidin (アクチン) 及び FITC (細胞膜) を用いて順次蛍光染色し、In Cell Analyzer 1000 を用いて行った。染色体異常試験は、CHL 細胞を用いて医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に準拠して行った。遺伝子発現解析は、培養開始後 2, 4, 8 時間及び 1, 3, 6 日目の細胞から total RNA を採取後、Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて行った。NH0st 細胞内蛋白質は培養開始後 1 日目の細胞から常法に従って調製した。吸収血清はスルホン化プレートにウシ胎児血清を分注し、4°Cで 16 時間インキュベーションして調製した。また、同プレートを PBS で洗浄した後、細胞溶解緩衝液を使用して吸着蛋白質を回収した。スルホン化プレート吸着蛋白質及び NH0st 細胞内蛋白質のショットガン解析に DiNa/LTQ-OrbiTrap 又は Paladigm MG4/QTRAP4000 を利用した。蛋白質の定量解析は TMT ラベル化法及び Progenesis LC-MS ソフトウェアにより行った。二次元電気泳動による定量解析は DeCyder 2D により行い、ProHunter を使用して目的スポットをピックアップ、ゲル内消化、脱塩した後、AB4800 又は DiNa/LTQ-OrbiTrap 分析に供した。蛋白質の同定は Proteome Discoverer 及び Mascot データベースを利用した。

2. ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発

1) ナノマテリアル

二酸化チタン、単層カーボンナノホーン (NHAs および NHox (開孔)、ポリスチレン、フラーレン、二酸化珪素、多層カーボンナノチューブ

2) 細胞

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株

(CHL) を用いた。医薬品をはじめとする各種化学物質の非臨床安全性試験で標準的に使用されている細胞株である。

3) 細胞毒性試験

4) 染色体異常試験

5) ナノマテリアル分散液の調製

メノウ乳鉢、卓上型超音波洗浄機 (W-113MK-II、爆洗、110 W、本多電子株式会社)、投入型超音波発生装置 (UR-200P, 200 W、トミー精工) を用いた。

6) 分散液中のナノマテリアルの粒子径測定

レーザー回折/散乱式で測定する LA-950 (堀場製作所、測定粒子径範囲 10 nm - 3 μ m, 測定波長 650 nm (半導体レーザー)、405 nm (LED)) を用いた。

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

試験材料には、Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb、Ti-Zr-24Nb、Ti、Zr、Nb 及び Ti-6Al-4V を用いた。試験材料の NaOH 処理は、NaOH 溶液に 60.0°C で 24 時間浸漬した。NaOH + CaCl₂ 処理は、NaOH 処理後に、CaCl₂ 溶液に 60.0°C で 24 時間浸漬した。また、NaOH + Ca(OH)₂ 処理は、NaOH 処理後に、Ca(OH)₂ 溶液に 60.0°C で 24 時間浸漬した。試料表面のカルシウム導入量は、蛍光 X 線分析によるファンダメンタルパラメーター法を用いて測定した。試料のアパタイト形成能は、試料を Ca²⁺ 及び Mg²⁺ を含有するハンクス平衡塩溶液に 37.0°C で 1 週間浸漬した後、走査型電子顕微鏡観察及び FT-IR/PAS により評価した。試料の細胞毒性は、V79 細胞を使用した直接接触法によるコロニー法を用いて評価した。試料の骨芽細胞適合性は、試料の上で 2 週間培養した正常ヒト骨芽細胞 NH0st の細胞数及び ALP 活性を指標として評価した。

4. 人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

1) 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 (パクスジーン社) 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。

2) DNA 抽出

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

3) 健常人の血液由来の DNA

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 を 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) であった。

4) 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 (γ-グルタミルカルボキシラーゼ) の 7 遺伝子について着目し、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 23SNPs を選定した。さらに炎症反応等に関わる遺伝子として VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8)、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 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 (Promega) 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)札幌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。

5) 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

大阪大学より抜去インプラントおよび診療情報入手した。抜去インプラントの各コンポーネントについて、目視等により、破損や傷などの状況を観察した。非接触式三次元形状測定機により 3 次元形状を測定し、変形の記録や摩耗量測定を行った。UHMWPE コンポーネントは、フーリエ変換式赤外分光光度計

(FTIR) を用いて分析し、酸化度、結晶化度、トランスビニレン指数を計算した。トランスビニレン指数から抜去インプラントが受けたガンマ線照射の線量を推定した。

UHMWPE に浸入する脂質による酸化度の算出への影響を調べるため、脂質を除去する方法について検討を行った。

破断を生じている試料では、その破壊様式を推定することを目的に破断面を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。また、これにより観察された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。

以上の測定分析結果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。

また、抜去インプラントに適用可能な小さな試験片を用いた疲労特性評価法について検討した。具体的には、試験片の寸法を変えて試験を繰り返し、試験片寸法による影響について検討を行った。

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

1) 実験動物

実験動物は雄のWistar系ラット (オリエンタル酵母、東京) の 9~10 週令を使用した。ラットを control (手術のみを行う群)、モデル人工硬膜品として汎用される濃度の OT 含有 PLGC 膜埋め込み群、高濃度 OT 含有 PLGC 膜埋め込み群、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜埋め込み群の 4 群に分けた。ラット数は 1 ヶ月観察群: control 群 10、モデル品 PLGC 膜群 10、高濃度 OT 含有膜群 10、高濃度 DBT 含有膜群 / 10、2 ヶ月観察群: control 群 11、モデル品 PLGC 膜群 11、高濃度 OT 含有 PLGC 膜群は 11、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜群で 10 であった。

ラットはポリカーボネート製のケージに同じ群のラットと 2 匹ずつの組で飼われ、餌と水を自由に摂取した。飼育室の環境条件は 14 時間 / 10 時間の light/dark サイクルで、温度は 22°C、湿度は 45% であった。動物の扱い及び処置に関しては、北里大学医学部動物実験・倫理委員会のガイドラインに従い、委員会にて許可を受けた。

2) PLGC 膜

モデル品は、汎用される濃度の OT 含有 PLGC 膜で、三重膜の構造をもった厚さ 300 μm のもので、触媒としての OT の濃度はスズ濃度で最大 20ppm を作製した。高濃度 OT 含有 PLGC 膜は厚さは 300 μm とし、残存スズの濃度を 200ppm とし、高濃度 DBT 含有 PLGC 膜は、同様に構造は三重膜で、厚さは 300 μm とし、残存スズの濃度を 100ppm とし、テラーメードで作製した。三種類の膜ともに、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。

3) ラットへの手術の方法、観察期間

ラットに腹腔内投与麻酔を行い脳定位固定装置 (SR-6R, Narishige) に固定した。ラット用補助イヤーは先端がとがっていないものを使用した。ラットの頭蓋骨を露出し、電動式手術器械 (ドリルシステム) Osada Success 40M2 (オサダメディカル) を用い、内径8mmのポントレフィンバーBTB-80 (長谷川メディカル) を用いて、頭蓋骨から直径8mmの円形の頭蓋骨片をくり抜いた。穴より、モデル品PLGC膜か、高濃度OT含有PLGC膜、または高濃度DBT含有PLGC膜を頭蓋内に入れ、上からくり抜いた頭蓋骨片をかぶせた。control群に関しては頭蓋骨片を戻した。骨膜及び皮膚を、針付きナイロン縫合糸で縫合した。術後1週間、手術部位を消毒した。

術後、同じ群から2匹ずつ一つのポリカーカーボネート製のケージに入れ飼育した。観察期間は1ヶ月または2ヶ月とし、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) 抗生物質の投与

観察期間を2ヶ月と設定した群に関しては、術後1週間、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。

5) オープンフィールド試験

観察期間終了後、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。

6) 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

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

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

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

7) 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。

8) 神経伝達物質の定量

2ヶ月観察群については、脳の表面部を観察し損傷の有無を評価した後に、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即座に氷冷した0.05 M perchloric acid with 0.1% cysteine に漬けてホモジェナイズし、神経伝達物質及びその代謝産物を抽出した。サンプルを遠心し、上清を更に0.2 μ mのポアサイズフィルターを用いて遠心濾過し、濾過液を神経伝達物質測定用として-80°Cで保存した。

電気化学検出器 (Electrochemical detector, ECD) 付高速液体クロマトグラフィーを用いて、ノルエピネフリン (norepinephrine, NE) ドーパミン (dopamine, DA)、ドーパミンの代謝産物、dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA)、インドールアミンであるセロトニン serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、セロトニンの代謝産物 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) を同時に測定した。システムは GL サイエンス ED703 ECD (GL サイエンス、東京)、日立 L-6300 ポンプ (日立、東京)、GASTORR BG-12デガッサー、GL サイエンス C0630カラムヒーター (GL サイエンス) で構成され、逆相カラム (Inertsil ODS-3, 4.6 \times 150 mm, particle size 5 μ m, GL サイエンス) を用いた。溶離液の組成は9.6 g/l citric acid, 100 mg/l sodium octane sulfate, 40 mg/l EDTA、15% メタノールであった。カラムヒーターは 35°Cに保持され、観察時間は30分間、流量 1.0 ml/minであった。標準溶液として100 ng/mlの濃度のNE bitartate, DA hydrochloric acid, DOPAC, HVA creatinine sulfate,

5-HIAA dicyclohexylammonium (Sigma)をそれぞれ含む 0.1% cysteine 入りの0.05 M perchloric acid を用い、検量線を作成し、定量を行った。

9) 統計解析

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。各指標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。

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

最初に開発したモデルは、強制的に深屈曲動作を与えることで人工膝関節インサートの応力状態を解析する簡易モデルである。CAD データを基に簡略化した人工膝関節モデルに、軟組織の影響を表現するための非線形バネモデルを組み合わせて数値モデルを構築した。解析法の妥当性を検証するため、現行の新旧2機種並びに可動域を拡大することを目的として開発中の新型機種に対して適用した。図3に新型機種CFKの解析モデルを示す。

次に開発を試みたモデルは、詳細な膝関節構造を導入した解析モデルである。図4に示すモデル構築の順に従い、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。CT画像から大腿骨、脛骨、膝蓋骨の輪郭を抽出し、重ね合わせることで生体骨の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、膝蓋腱、膝蓋靭帯、内側側副靭帯、外側側副靭帯等の軟組織の3次元ソリッドモデルを作成した。次に、生体骨と軟組織を組み合わせて作成した生体膝モデルに簡略化した人工膝関節モデルを装着することで解析モデルを開発した。深屈曲解析の場合の境界条件を図5に示す。屈曲角度に依存する荷重 F_N 、 F_T はスクワット運動に対応している文献を参考にした。

第3のモデルはバーチャル・シミュレータである。その外観を図6に示す。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、CADデータを基に簡略化したものである。膝関節モデルは、図6に示すように円形断面の剛体棒で機械構造部と連結している。また、筋肉としては大腿四頭筋のみを考慮しており、図6に示すように機械構造部の大腿骨に対応する部分に連結されている。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。

これらすべてのモデルに対して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

1) 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。ストラットの中心断面とネックが一致するように脳動脈瘤モデル内に配置した。長軸直径、短軸直径ともに4[mm]の円形である。

ステントストラットは直方体で単純化した。脳動脈瘤用ストラットのサイズは $0.2 \times 0.2 \times 2$ [mm] または $0.2 \times 0.2 \times 1$ [mm] のものを用いた。

2) 実形状ステントによる血流測定

現在の医療用画像装置の解像度が約0.2[mm]程度であるのに対してステントストラットのサイズが約0.1[mm]程度であるため、医療用の画像装置を用いることで脳動脈瘤用ステントの形状再構築を行うことはほぼ不可能である。そこで、ステント形状と脳動脈瘤の形状の再構築を個々に行い、CAD技術を用いてステント形状を脳動脈瘤形状に設置・マージした。

脳動脈瘤形状の再構築にあたって、まずDigital Subtraction Angiography (DSA)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アームを回転させた。その間撮影し、合計約100枚の回転血管画像を構成した。回転血管画像取得後、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。

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

そこで、ステント形状と脳動脈瘤の形状の再構築

を個々に行い、CAD技術を用いてステント形状を脳動脈瘤形状に設置・マージした。

脳動脈瘤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 [μ A]でマイクロCT (SMX-100, 島津製作所)により撮影を行った(図18-1、図18-2)。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。

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、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

光学式3Dデジタイザによる摩耗量測定の可能性の検証

人工股関節のステムや、口腔外科用骨固定プレート、抜去人工股関節のUHMWPEライナーに対して、光学式3Dデジタイザ (VIVID 9i (コニカミノルタセンシング(株)))を用いて形状計測を行った。冠動脈ステントについては、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)))を用いて形状計測を試みた。

形状計測により得られた形状データから特に歯科用骨固定プレート (Stryker社, 56-28087)を取り上げ、手術時に加えられる変形を考慮した弾塑性有限要素解析を行った。この骨固定プレートは、手術時に医師が下顎骨の形状に沿うように変形させてから用いられることから、プレートが下顎骨に近い形状になるような境界条件を設定して解析を行い、塑性ひずみ分布と残留応力分布を調べた。解析には、ANSYS 11.0を用いた。

抜去品のUHMWPEライナーの形状計測データから摩耗前の形状を推測するための計算手法を考案した。この計算手法では、摩耗前形状がライナーの中心軸に中心をおく球であると仮定し、測定データの一部とよく重なる球を探索することで摩耗前形状を推測する。計算によって得られた摩耗前形状から測定された形状 (摩耗後の形状)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

引張試験機 (AGI-250kN, Shimadzu Corp.)の上部に許容最大荷重50Nのロードセル (SLBL-50N, Shimadzu Corp.)を、引張試験機下部に頸静脈固定専用治具を取り付けた。この専用治具は角度設定が可能な機構を具備し、鉛直方向に固定したガイドワイヤーおよびダイレータに対し、15degから60degまで15deg毎に挿入角度を変更可能とした。ここで、計測対象はブタ頸静脈を用いた。試験はダイレータを下方に変位させた際の荷重を各挿入角度に対し計測し、頸静脈、ダイレータ及びガイドワイヤーの状態を観察することで行った。

医師の作業領域が計測できる位置にステレオカメラ (miniBEE, Viewplus Inc.)、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しながら、対象の計測を行った。精度検証のため、平板、半球を対象に計測し、応用として人体模型へのダイレータ挿入状況を計測した。

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

1) 試験物質

生分解性バイオマテリアルであるP1, P2, P3, P4, P5, 6, 7, 8 (多木化学株式会社で、テラーメイドで合成)

Tributyltin (IV) chloraide : 塩化トリブチルスズ (Wako)

2) h-CLAT

細胞

THP-1細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC)から購入し、RPMI-1640 (GIBCO)培地に10%のfetal bovine serum (FBS)と0.05mMの2-mercaptoethanolおよびpenicillin/streptomycinを添加し培養した。実験には培養を始めて2週間後から2月以内の細胞を用いた。さらに実験に使用する際は前培養としてTHP-1を0.1-0.2×10⁶ cells/mlで播種し、48時間あるいは72時間培養した。なお、前培養終了時の細胞濃度は1×10⁶ cells/ml以上にならないようにした。

(a) 濃度設定試験

生分解性バイオマテリアルである P1, P2, P3, P4, P5, 6, 7, 8 はそれぞれ DMSO に解かして最高濃度の溶液を調製した. 塩化トリブチルスズは V79 コロニーアッセイにおいて 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 μg/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. 細胞を処理する際は、細胞浮遊液と同量の working solution を添加した. したがって、最終的には各 stock solution の 500 倍希釈濃度で細胞を処理した.

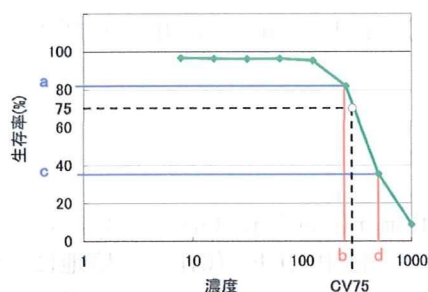
陽性対照である 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB, Alderich) は Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma) に 2 mg/ml になるよう溶解し、stock solution をとした. 平底 96 well プレートに THP-1 細胞浮遊液 2 × 10⁶ cells/ml を 80ul/well で播種し各濃度希釈系列の working solution の 80ul を添加し、CO² incubator で 24 時間培養した.

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 濃度から下記の計算式により CV75 を計算した.

$$\text{LogCV75} = (75 - c) \times \text{Log}_{10} b - (75 - a) \times \text{Log}_{10} d / a - c$$



(b) 本試験

CV75 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 × 10⁶ 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 μl に懸濁し、4℃ で 15 分間ブロッキングした. 反応終了後、180 μl 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 pharmingen: 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 (%) =	$\frac{\text{添加剤処理細胞の MFI} - \text{添加剤処理細胞の isotype control の MFI}}{\text{Control (溶媒) の MFI} - \text{Control (溶媒) isotype control の MFI}}$	× 100

*MFI = (geometric) mean fluorescence intensity.

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.

2) 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.

生分解性バイオマテリアルでは、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、塩化トリブチルスズでは、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 (DNCEB)) 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 μ l 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

材料埋植後の炎症反応に関する検討用炎症系細胞モデル候補としてヒト単球由来の株化細胞である THP-1 を選択し、本研究に使用できるかどうかを検討した。炎症の指標候補としては、簡便に測定ができ、また phorbol ester 刺激による THP-1 からの産生が多く報告されている活性酸素を選択した。THP-1 からの活性酸素産生を確認するとともに、その測定のための最適な条件を検討するため、THP-1 を活性化することが知られている化学物質で刺激を加えて活性酸素産生量を測定することで、そのモデル細胞としての可能性を検討した。

本研究で使用するモデル材料は、その物理化学的及び化学的表面特性が制御可能で様々な特性を有するものが望ましい。そこで、金蒸着表面への自己組織化膜形成を利用することで表面官能基組成が制御されたモデル表面の作製を試みた。基材として、円形カバーガラスの片面に 3nm のチタン層をコートした後に 25nm の金層をコートしたものを用いた。この基材を、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単一官能基からなるモデル表面を調製した。作製した表面は、以下の 6 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、6) 硫酸基

当初、リン酸基及び硫酸基に関しては、水酸基表面を調製後、化学反応処理を行いこれらの官能基表面を調製した。なお、リン酸基に関しては、2 年目から試薬が販売されたため、以後は基本的にその試薬を使用して研究を行った。また、試薬が存在する官能基に関しては、undecanethiol 溶液に他の試薬溶液を種々の比率で混合した溶液と反応を行うことで、様々な比率でメチル基と他の官能基をもつ 2 官能基表面を 4 種類調製して研究に使用した。なお、これらのモデル表面は調製後、表面解析を行いその特性を評価した。

これらのモデル表面を用いて、細胞を用いた 2 種類の検討を行った。まず、これらの表面上に市販のヒト正常骨芽細胞 (NH0st) を培養し、その接着、増殖

及び分化程度を評価した。また、モデル表面上で代謝協同阻害試験を行い、官能基表面が細胞集団の恒常性維持に重要な機能である細胞間連絡機能に与える影響を評価した。これらを通して、表面官能基及び特性が細胞挙動に与える影響を検討した。

13. 米国不具合報告データ解析による医療機器のリスクアセスメント手法開発

FDA の不具合データをダウンロードし、データベースに再構築後、機器の種類、及び不具合ごとに分類し、時系列に追うことで、不具合の傾向を掴むこととした。専ら、年と各項目とのクロス集計表を作成して解析を行った。今年度は、心臓血管系を中心に取上げた。前年度の手法を踏襲し、臨床的に影響が大きいと推測される、製品に問題があるとされた報告、Adverse Event を生じた事例に焦点を置き、報告数が多い心臓血管系、整形外科系の報告を中心に取上げた。また、参考までに、日本の不具合報告についても集計を行った。

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

細胞培養プレート表面へのスルホン基の導入量は処理後 2 時間まで時間依存的に増加することが明らかになった。また、プレート表面の静的接触角はスルホン化処理時間に比例して低値を示すことも確認された。

TetraColor ONE を用いて測定した細胞増殖度はスルホン化処理により大きな影響を受けなかったが、蛍光イメージングにより細胞数を解析した結果、増殖率はスルホン化処理時間に比例して減少することが確認された。一方、分化マーカーである ALP 活性、オステオカルシン産生量、Ca 産生量はスルホン化時間に比例して顕著に上昇することが確認された。また、同プレートは CHL/1U 細胞に対して細胞毒性及び染色体異常誘発性を示さなかった。

成長因子群に着目して網羅的遺伝子発現解析を行った結果、成長因子に対する応答を制御する機能を持つ ZFP36L1 遺伝子の発現量が培養開始後 2 時間目に顕著に上昇することが確認された。IGF 関連遺伝子 (IGFBP4、IGFBP7、IGF2、IGF1R、IRS2)、TGF- β 関連遺伝子 (ACVR1C、TGFB2、TGFB3)、BMP 及び TGF- β スーパーファミリー遺伝子 (GDF5、GDF15) のほか、NRP1、STAT2 及び WISP1 遺伝子の発現量も早期に上昇した。一方、FGF1、FGF2 及び FGF5 遺伝子は発現量が顕著に低下した。

スルホン化プレート吸収血清を用いた培養系では、NH0st の増殖能及び分化能ともに低下することが確認された。同プレートに吸着した蛋白質は全血清蛋白質の 0.5% 程度に相当し、二次元電気泳動解析において血清蛋白質とは明らかに異なる泳動パターンを示した。二次元

電気泳動/DeCyder 2D 解析の結果、スルホン化プレート吸着蛋白質からは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。MS解析の結果、134スポット中、TETN、IBP2、CO1A1、CO1A2を含む129スポットの蛋白質が同定された。同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、NHOst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。

スルホン化プレート上で培養したNHOst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。これらの中には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、NHOst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。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NHOst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NHOst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。

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、DNAアレイ解析のデータを利用して、これら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NHOst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。NHOst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NHOst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。

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

材料の分散液調製において問題となった材料物性は強い疎水性で、カーボンナノホーンが該当していた。材料を液中に取り込むことができなかったが、DMSOに懸濁後、培地に入れると容易に液中に取り込むことができた。液中での粒子径を小さくする手段としては、投入型超音波発生装置が効果的であった。

サイズ標準PS粒子を用いた実験で、0.92-4.45 μm サイズの粒子が特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

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。Zrは、NaOH + Ca(OH)₂処理のみでカルシウムを導入できた。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V及びTiのアパタイト形成能は、NaOH処理、NaOH + CaCl₂処理、NaOH + Ca(OH)₂処理の順に高くなった。Ti-Zr-8Nb及びZrは、NaOH + Ca(OH)₂処理においてのみアパタイトを形成した。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処理により細胞毒性が弱くなった。その他の試験材料は、処理の有無にかかわらず、細胞毒性は認められなかった。NHOst細胞の細胞数は、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ではいずれも増加した。その他の試験材料では、処理の有無による細胞数の相違は認められなかった。NHOst細胞のALP活性は、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処理の順に増加傾向が認められた。その他の試験材料では、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(全例パルナ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名と、対照として健常な日本人の血液由来の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た。

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)。

また、既にターゲットとして選定している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てまとめた。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に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

10例の抜去インプラントを入手し、分析を行った。内訳は、人工股関節9例(うちバイポーラ型人工骨頭8例)、人工足関節1例であった。

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ものがあり、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、摩擦が生じたためと思われる。一方、摺動面の金属側に目立つ傷が見られたものはなかった。

UHMWPEライナーでは、破損が確認された症例が2例あった。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。これらはいずれもバイポーラ型人工骨頭の、骨頭をUHMWPEライナー内部に保持しておく機構部分やリム部分で生じていた。

滅菌のためのガンマ線照射が行われていると推定されたものが6例、エチレンオキサイドガス滅菌など、その他の方法で滅菌されたものと推定されたものが4例あった。高度架橋UHMWPEはなかった。これらの推定結果は診療情報とも一致した。最大酸化度が4を超えていたものが4例のうち3例で破損やき裂が観察された。これらはいずれもガンマ線照射が行われていたものであった。その他6例の最大酸化度は2以下であった。酸化度が高かったものでは結晶化度が70%を超えていたのに対し、それ以外のものでは61~67%の間に分布していた。

脂質の浸入の影響で酸化度は大きく計算されること、および、脂質の除去が有効であることがわかった。

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。

UHMWPEの破断が直接の不具合の要因となったものが1例あった。破断面にはビーチマークが観察され、疲労によるものと思われた。力学試験による再現の結果、き裂成長の過程で圧縮力が働くことにより類似の特徴が再現されることがわかった。

2例では、インプラントの解析から不具合にいたる要因が見当たらず、診療情報からもこれが確認され