

201034002B

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-サイエンス総合研究事業

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な  
安全性評価に関する研究  
-発がん性を主体とした再評価と国際調和-

(H20-医薬-一般-003)

平成 20～22年度

総合研究報告書

研究代表者 関田 清司  
国立医薬品食品衛生研究所

平成 23 (2010) 年 3 月



厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリ-サイエンス総合研究事業

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な  
安全性評価に関する研究  
-発がん性を主体とした再評価と国際調和-

(H20-医薬-一般-003)

平成 20～22年度

総合研究報告書

研究代表者 関田 清司  
国立医薬品食品衛生研究所

平成 23 (2010) 年 3 月

別添 1

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

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究  
-発がん性を主体とした再評価と国際調和-  
(H20-医薬-一般-003)

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 関田 清司

平成 23 (2011) 年 3 月

別添 2

目 次

I. 総合研究報告書	
生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究 -発がん性を主体とした再評価と国際調和- ( H20-医薬-一般-003 )	----- 1
関田 清司	
(資料1) 埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討	
(資料2) 埋設材料の遺伝子発現データ解析	
(資料3) 安全性試験に関する情報収集 (各国の規制当局の情報収集を含む)	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 72
III. 研究成果の刊行物・別冊	----- 72

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

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究

-発がん性を主体とした再評価と国際調和-

研究代表者 関田清司

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部動物管理室・室長

#### 研究要旨

人体に埋植される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すこと、及び、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証するとともに、異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにすることを目的に研究を行った。ガラスあるいはプラスチック板を皮下に埋植した p53 遺伝子ヘテロ欠失 (p53+/-) マウスの異物発がん実験の結果、コンベンショナルな条件下で飼育したマウスは germ-free (無菌) の条件下で飼育したマウスより早期に腫瘍発生を生じることを示唆する結果が得られた。さらに、p53+/-無菌マウスを作製し、板状ガラスの皮下移植手術を実施、その発癌率を調べる追加実験を実施した。その結果、腫瘍サイズが有意に無菌マウスで小さいことが明らかとなった。また、埋植手術の術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を、p53+/-マウスを用いて調べた結果、腫瘍サイズが厳重消毒群で有意に小さいことが明らかとなった。異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにするため、埋植周囲組織を対象に定量的なマイクロアレイ解析を行った結果、炎症・免疫、酸化ストレス、線維化、Wnt シグナル等に関与する遺伝子群の発現増加を明らかにした。海外の手術を伴う試験の実地調査及び情報収集を行った結果、埋植材料の異物発がん実験において細菌環境の制御と術野の消毒処置が重要であることが示された。

## 研究分担者

- 児玉幸夫 国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・  
毒性部・研究員
- 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・  
毒性部・室長
- 大室弘美 武蔵野大学・薬学部・医薬品情  
報学教室・教授

## A. 研究目的

平成 17 年度からの 3 年間に先行して実施された厚生労働科学研究費補助金「生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調和— (H17-医薬-一般-019)」において、微生物環境を制御した p53+/-マウスを用いた研究から「細菌共存環境」が埋植材料の発がんを修飾する要因であることを示唆する知見が得られた。

本研究の目的は、これまでの研究をさらに推進し、人体に埋植される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すこと、及び、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証するとともに、異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにすることである。げっ歯類を用いた埋植材料の安全性試験（毒性試験）は、通常、1～2 cm 角、厚さ 1 mm 内外の板状の被検物（埋植材料）を動物の上背部皮下に埋植し、長期にわたり観察する。その結果、異物発がん（悪性線維性組織球腫（MFH）様の肉腫）を高率

に引き起こすことが知られている。しかし、ヒトにおける発がんの報告は皆無に等しい。但し、例外として感染が加わった際に発がんが起こることが知られている。この差を科学的に検証することは、材料と生体の化学的相互作用と、単なる物理的性状要因を正しく区別し、今後の埋植物安全性評価の正確性の向上に繋がり、開発促進と安全性向上の両面から患者にとって有益であると考える。

## B. 研究方法

### 1. 埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討

germ-free の p53+/-マウスを用いた異物発がんの確認試験を実施した。雌 p53+/-germ-free マウス（C57BL/6N）に対してガラスの板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行った。さらに、術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を SPF 条件下の雌 p53+/-マウス（12 週令）を用いて比較した。厳重消毒においては、安全キャビネット内で動物の背部をイソジン液で複数回消毒後、オートクレーブ滅菌した手術器具を用いてガラス板の埋植手術を実施した。手術器具は 1 匹ずつ交換した。一方、簡易消毒では SPF 動物室内で動物の背部をヨードチンキで消毒後、70%エタノールで消毒した。手術器具は 70%エタノール液に浸して消毒したものを用い、繰り返し同様に消毒して別の動物の埋植手術に使用した。

### 2. 埋設材料の遺伝子発現データ解析

これまでの実験で p53+/-マウス皮下に

ガラス板を埋植すると、埋植後 25 週から肉眼的に腫瘍が観察され始めることを確認した。高木、児玉らは雌 p53+/-マウス皮下にガラス板を埋植し、10、15 及び 20 週後に経時的に採取したガラス板周囲皮下組織をマイクロアレイ解析に用いた。対照群にはガラス板を埋植しなかったシャムオペレーション群を用いた。のべ 34,000 遺伝子の発現解析が可能なアフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 230 2.0 Array を用いた。マイクロアレイ解析は国立医薬品食品衛生研究所毒性部で菅野らにより開発された定量的マイクロアレイ解析法 (Percellome 手法 (Kanno J, et al., "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics. 29;7:64, 2006.)) にて実施した。

### 3. 各国の規制当局の情報収集を含む埋植物の安全性試験に関する情報収集

実験動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性 (皮膚の消毒、手術時の無菌性等) 並びに術後感染制御等に関する情報を得るために、本邦の GLP 適合施設等を有する法人へのアンケート調査を行った。また、GLP に適合した海外 (カナダ) の安全性試験受託施設での手術を伴う試験 (infusion 試験におけるカニューレの留置のための手術) に関する実地調査及び情報収集を行った。さらに、げっ歯類の手術のうち術後も生存させる手術 (生存手術) について、海外 (主に米国) の大学等の施設の動物倫理委員会 (IACUC) のガイドライン等を調査した。

## C, D. 結果と考察

### 1. 埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討

1) 無菌 p53 ヘテロ欠失マウス (C57BL/6N) に対してのガラスの板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行う試験を実施した。なお、対照群にはシャムオペレーションを実施した群を設定した。発がん性を観察中であるが、実験はおおむね終了した。そこで、前回実施したコンベンショナルな条件下で飼育したガラス板埋植マウスの異物発がんのデータと今回実施した germ-free の条件下で飼育したガラス板埋植マウスの発がん性を初発腫瘍確認日 (皮下約 5mm φ 時点) を基に比較したところ、カプランマイヤー法による統計解析で有意な差は認められなかった。また、腫瘍径 13mm 時点のデータを基に同様に検討したが、有意差は認められなかった。前回の実験と結果に差が生じた原因については、前回はコンベンショナルなマウスの実験結果から腫瘍サイズを基に、近似的に初発腫瘍発生時期を計算したものであり正確ではなかったことが考えられた。そこで、1 回目に実施された germ-free 群の初発腫瘍発生時期を 2 回目の germ-free 群から計算した。軽度ではあるが、germ-free 群で腫瘍発生時期が早くなる傾向が認められたが、有意差が認められた。逆に、2 回目に実施した germ-free 群の初発腫瘍発生時期を conventional な実験のものから計算してみると、軽度ではあるが germ-free 群で腫瘍発生が見かけ上遅延する結果が得られた。以上より、1 回目と 2 回目で見かけ上結果が異なった原因の一つとして、

1 回目では近似的に初発腫瘍発生時を算出したことが考えられた。次に、初発腫瘍発生日に加えて、生じた腫瘍のサイズについて解析した。その結果、ウィルコクソンの順位和検定で、腫瘍サイズが有意( $p < 0.001$ )に germ-free 群で小さいことが明らかとなった。一方、腫瘍採取時期に有意差は認められなかった。この結果、「細菌環境」は腫瘍の発生よりも腫瘍サイズの増大に関与していることが示唆された。

2) 術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を SPF 条件下の雌 p53 ヘテロ欠失マウスを用いて比較した。その結果、ガラス板埋植により埋植部位に腫瘍が埋植後 25 週前後から発生したが、消毒法の違いによる腫瘍発生率を初発腫瘍確認日(皮下約 5mm  $\phi$  時点)を基に間に比較したところ、有意な差は認められなかった。また、腫瘍径 13mm 時点のデータを基に同様に検討したが、有意差は認められなかった。しかし、生じた腫瘍のサイズについてウィルコクソンの順位和検定を行った結果、腫瘍サイズが有意( $p < 0.001$ )に厳重消毒群で小さいことが明らかとなった。一方、腫瘍採取時期に有意差は認められなかった。この結果、消毒の厳重度による「細菌環境」が腫瘍サイズの増大に関与していることが示唆された。

## 2. 埋設材料の遺伝子発現データ解析

マイクロアレイ解析の結果、 $t$ -検定により有意( $p < 0.05$ )に増加したのべ遺伝子数は 10 週目で 807、15 週目で 940、20 週目で 766、有意( $p < 0.05$ )に減少したのべ遺伝子数は 10 週目で 355、15 週目で 566、20 週目で

840 であった。有意( $p < 0.05$ )に変動した遺伝子を対象にジーンオンロジー解析を行った結果、10 及び 15 週目で「免疫応答」、「炎症」、「細胞走化性」等に関する炎症関連遺伝子発現の増加が特に顕著であった。さらに、パスウェイ解析ソフト Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行ったところ、10 及び 15 週目で増加する遺伝子で、「inflammatory response」、「cellular movement」、「immune cell trafficking」等の炎症・免疫反応に関連する系が、また「hematological system development and function」の血管形成に関する系が抽出された。20 週目で増加する遺伝子でも同様に、これらの系が抽出されたが、相対的頻度は減少していた。10、15、及び 20 週後の減少遺伝子では明らかな系は抽出されなかった。個別の遺伝子に着目して解析を行ったところ、免疫・炎症関連遺伝子は埋植後 10 及び 15 週で大きく増加し、20 週でその増加の程度が小さくなるものが多く認められた。具体的には chemokine (C-C motif) ligand 8 (CCL8) 及び CCL9、CCL6、CCL11、CCL24、補体成分の C1qa、C1qb、C1r、B 細胞や単球に発現する  $Fc\gamma$  受容体である Fcgr1、Fcgr2b、Fcgr3 等の多くの遺伝子発現増加が認められた。同様に、血管形成、細胞外マトリックス、線維化等に関与する増加遺伝子の種類を同定した。これらの変化はガラス板埋植による炎症・異物反応とその後のカプセル化の組織学的変化を反映したものと考えられた。異物発がんに関しては活性酸素の関与が示唆されている。そこで関連遺伝子を検索したところ、heme



oxygenase 1 (Hmox1)が10週目で増加傾向、15週目で有意に増加した。さらに、活性酸素産生酵素である dual oxidase 1 (Duox1)が10週と20週で有意に増加し、15週でも増加傾向を示した。また、同じく活性酸素産生酵素である NADPH oxidase 4 (Nox4)が10と15週で有意に増加した。異物発がんメカニズムに関連する報告として、間葉系幹細胞で Wnt シグナルを抑制すると悪性線維性組織球種が発生することが知られている。そこで、本実験でも Wnt シグナル関連遺伝子に着目して解析を行った。その結果、分泌型シグナル因子である Wnt2 が10週目で有意に増加し、15週目でも増加傾向を示した。一方で、Wnt 抑制分子の Dkk2、Dkk3 が10週目で有意に増加し、同じく Wnt 抑制分子の Sfrp1 と Sfrp2 が10及び15週目に有意に増加し、Sfrp5 が20週目で有意に増加した。また、Sfrp3、Sfrp4、もそれぞれ増加傾向を示した。これらの結果、本実験での異物発がん過程において酸化ストレスや Wnt シグナルの変化が関与している可能性が示唆された。

### 3. 各国の規制当局の情報収集を含む埋植物の安全性試験に関する情報収集

1) 本邦の GLP 適合施設における手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、手術時の無菌性等）並びに術後感染制御等に関するアンケート調査

本邦の GLP 適合施設等を有する法人の毒性試験実施部門、薬理試験実施部門及び薬物動態試験実施部門等における実験動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、手術時の無菌性等）並びに術後感染

制御等に関する情報をアンケート調査により収集した（GLP を遵守して実施される安全性に関する非臨床試験の他に、薬理試験及び薬物動態試験に関するものを含む）。

調査内容は、ヒトの手術の場合と比較するために米国疾病対策・予防センター（CDC）の「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」に記載されている手術環境に関する事項である。本アンケートの調査により明らかになったマウスやラット等の場合とヒトの場合との大きな違いは、以下のとおりであった。

- ① 手術部位の皮膚の消毒に用いる薬物が異なる。
  - ② 切開部位以外からの感染を避けるための措置、例えば覆布が使用されていない。
  - ③ 手術に用いるピンセット、ハサミやメス等の消毒方法が一部異なり、また、それらが再使用されている。
  - ④ 術後の創傷の管理のために、げっ歯類では通常は抗菌剤の投与はせず、また、切開創を被覆剤で保護していない。
- 以上の結果から、GLP 施設等における SPF マウスやラットの手術に関して、ヒトの術後感染の制御の観点からは、SPF としての管理及び取扱いに加え以下のような点に注意して行うことが必要と考える。
- (a) 切開部位以外の部位からの感染をさけるため、切開部位以外の部位を覆布で覆う。
  - (b) 皮膚の消毒にはヒトの場合と同様にポビドンヨードを用い、消毒に必

要な時間放置後に皮膚の切開等を行う。

(c) 手術に用いるピンセット、ハサミやメス等は滅菌して用い、少なくとも別の動物への再使用は避ける。

(d) 可能であれば、切開部位からの感染を避けるため被覆剤等で覆う。

(e) 他の個体に傷口をなめられると皮膚常在菌、口内細菌等により汚染されるため、1匹ずつケージで飼育する。また、傷口を自身で舐めることが可能な場合は、エリザベスカラー等を装着させる等して、動物自身で舐めることができないようにする。

(f) 試験成績に影響しない場合は、手術前及び／又は手術直後に適切な抗菌剤を使用する。

2) 海外(カナダ)のGLP適合施設におけるげっ歯類の手術時の術野の無菌性(皮膚の消毒、手術時の無菌性等)並びに術後感染制御等に関する調査

実験動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性(皮膚の消毒、手術時の無菌性等)並びに術後感染制御等に関する情報を得るために、GLPに適合した海外(カナダ)の安全性試験受託施設における手術を伴う試験(infusion試験におけるカニューレの留置のための手術。ラット)に関する実地調査を行った。この結果、

- ① 手術部位の消毒に複数の消毒薬を用いること、
- ② 動物に直接接触する手術機器の再使用は同一動物にしか行なっていないこと及び再使用する場合には機器を消毒すること

③ 切開部位以外を覆布で覆っていること、  
④ 術中及び術後感染制御のために抗菌剤を一定期間使用していること、さらに、

⑤ 調査した施設の1つは傷口からの感染を防ぐため滅菌したジャケットを術後の動物に着用させること等が、昨年度のアンケート調査の結果とは異なっていた。

これら①～⑤の事項は、前年度のアンケート調査の結果からで、手術環境において改善が必要と考えられた事項であった。本調査の結果、調査対象となった施設における実験動物の手術時の術野の無菌性(皮膚の消毒、手術時の無菌性等)、並びに術後感染制御等はヒトの場合(CDC)とほぼ同等であることが明らかになった。

3) 海外(主に米国)の大学等の実験施設の動物倫理委員会(IACUC)のガイドライン等におけるげっ歯類の手術時の術野の無菌性(皮膚の消毒、手術時の無菌性等)並びに術後感染制御等に関する調査

げっ歯類の手術のうち術後も生存させる手術(生存手術)について、本年度は海外(主に米国)の大学等の施設の動物倫理委員会(IACUC)のガイドライン等を調査した。それらのガイドラインは動物保護法(米国)及び動物実験の指針、ALAAC(Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)等の基本的考え方に基づき、げっ歯類の生存手術における無菌手術(Aseptic Surgery)の重要性を勘案した具体的な規定が示されており、その内容はCDCの手術部位感染防止ガイドラインに示された人の手術環境、設備及び術者の手技

等とほぼ同様であった。既に厚生労働科学研究（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生物由来の医療機器にかかわる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調査—平成 17 年度～平成 19 年度）で報告したように、細菌感染による慢性炎症が発癌に関与するとする論文も多く、また、当該研究でもそれを示唆するデータを得ている。このため、上述した IACUC のげっ歯類の生存手術に関するガイドライン等を遵守することが、細菌共存環境の影響を排除し、検体の物理的形狀に依存せず、化学的活性のみに依存する発がん性試験等の適切な実施のために必要であると考えられる。

今後は、本調査により収集したげっ歯類の生存手術に関する情報を、何らかの形で本邦の大学等の実験施設に提供する予定である。

#### **E. 結論**

P53<sup>+/+</sup>-マウスを用いた異物発がん試験において、germ-free マウスでは腫瘍サイズが有意にコンベンショナルな条件下で発生した腫瘍より小さいことが明らかとなった。また、厳重消毒では簡易消毒と比較して有意に腫瘍サイズが小さいことが明らかとなった。これらの結果、埋植材料の異物発がん実験において細菌環境の制御と術野の消毒処置の重要性が明らか

となった。

異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにするため、雌 p53<sup>+/+</sup>-マウス背部皮下にガラス板を埋植し、10、15 及び 20 週後に採取した埋植周囲組織を対象に定量的なマイクロアレイ解析（Percellome 法）を行なった。この結果、炎症・免疫、酸化ストレス、線維化等に関与する多くの遺伝子群の発現増加を明らかにした。

医療素材の移植実験に関する国内外の情報を整理した。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### **H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）**

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討

研究分担者：児玉幸夫 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・研究員

研究分担者：関田清司 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部動物管理室・室長

研究要旨

これまでのガラスあるいはプラスチック板を皮下に埋植した p53 遺伝子ヘテロ欠失 (p53+/-) マウスの異物発がん実験の結果、コンベンショナルな条件下で飼育したマウスは germ-free の条件下で飼育したマウスより早期に腫瘍発生を生じることを示唆する結果が得られた。平成 20-22 年度は p53+/- germ-free マウスを新たに作製、ガラス板の埋植手術を行い、その発がん性を確認する追加実験を継続実施し、実験をほぼ終了した。その結果、germ-free マウスでは初発腫瘍確認日に基づく腫瘍発生時期及び率のカプランマイヤー解析で有意差は見られなかったが、腫瘍サイズが有意にコンベンショナルな条件下で発生した腫瘍より小さいことが明らかとなった。また、一般的に実施可能な試験法を提案するための条件の検討を行う目的で、術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を SPF 条件下の p53+/- マウスを用いて比較した。この結果、初発腫瘍確認日に基づく腫瘍発生時期及び率のカプランマイヤー解析で有意差は見られなかったが、厳重消毒群では有意に腫瘍サイズが小さいことが明らかとなった。これらの結果、埋植材料の異物発がん実験において細菌環境の制御と術野の消毒処置の重要性が明らかとなった。

A. 研究目的

平成 17 年度からの 3 年間に先行して実施された厚生労働科学研究費補助金「生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調和— (H17-医薬-一般-019)」において、微生物環境を制御した p53

ヘテロ欠失マウスを用いた研究から「細菌共存環境」が埋植材料の発がんを修飾する要因であることを示唆する知見が得られた。本研究の目的は、これまでの研究をさらに推進し、人体に埋植される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来動物実験の問題点を見直すこと、及び、可能

性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証することである。げっ歯類を用いた埋植材料の安全性試験（毒性試験）は、通常、1～2 cm 角、厚さ 1 mm 内外の板状の被検物（埋植材料）を動物の上背部皮下に埋植し、長期にわたり観察する。その結果、異物発がん（悪性線維性組織球腫（MFH）様の肉腫）を高率に引き起こすことが知られている。しかし、ヒトにおける発がんの報告は皆無に等しい。但し、例外として感染が加わった際に発がんが起こることが知られている。この差を科学的に検証することは、材料と生体の化学的相互作用と、単なる物理的性状要因を正しく区別し、今後の埋植植物安全性評価の正確性の向上に繋がり、開発促進と安全性向上の両面から患者にとって有益であると考えられる。これまでの研究の結果、無菌状態で飼育した動物では異物発がんの発生率が低下することが示唆された（図 1）。しかし、この初期の無菌条件下の実験では初発腫瘍発生の見落とし例が多く、後で実施されたコンベンショナルなマウスの実験結果から腫瘍サイズを基に、近似的に初発腫瘍発生日を計算したものであった。そこで、無菌条件下の埋植実験の追試を実施することとした。また、一般的に実施可能な試験法を提案するための条件の検討を行う目的で術野の厳重消毒と簡易消毒の相違が埋植異物発がん発生率に及ぼす影響を SPF 条件下の p53+/-マウスを用いて比較した。

## B. 研究方法

### 1) Germ-free の p53+/-マウスを用いた異物発がんの確認試験

無菌手術環境及び無菌術野の作出に関しては、germ-free 動物の実験・飼育動物施設、及び、実験機材を継続して使用し、無菌 p53+/-マウス（C57BL/6N）に対してガラスの板状検体（松浪硝子工業製カバーガラス；10mm x 5mm、厚さ 1.1mm、四隅を研磨したもの）の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行ない（写真 1 参照）、初発腫瘍発生時期を確認した。なお、腫瘍サイズが 13mm 径になった時点で解剖することとした。

A)

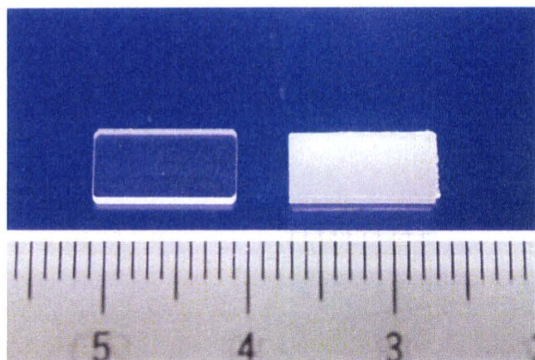


B)





C)



### 写真 1. Germ-free の飼育設備と埋植材料

A) Germ-free 飼育用ビニールアイソレーター、B) 同アイソレーター内での埋植手術、C) 埋植材料：左はガラス板、右はプラスチック板（食品薬品安全センター秦野研究所頒布の短期筋肉内埋植試験用高密度ポリエチレンシート 10mm x 5 mm、厚さ 1mm）（今回は発がん性がより強かった左のガラス板を使用）

### 2) 術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響解析

術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を SPF 条件下の雌 p53+/-マウス（12 週令）を用いて比較した。厳重消毒においては、安全キャビネット内で動物の背部をイソジン液で複数回消毒後、オートクレーブ滅菌した手術器具を用いてガラス板の埋植手術を実施した。手術器具は 1 匹ずつ交換した。一方、簡易消毒では SPF 動物室内で動物の背部をヨードチンキで消毒後、70%エタノールで消毒した。手術器具は 70%エタノール液に浸して消毒したものを用い、繰り返し同様に消毒して別の動物の埋植手術に使用した。なお、一群の

動物の匹数は厳重消毒のガラス板埋植群で 30 匹、同シャムオペレーション群 35 匹、簡易消毒のガラス板埋植群で 83 匹、同シャムオペレーション群で 39 匹であった。初発腫瘍発生時期を確認し、腫瘍サイズが 13mm 径になった時点で解剖することとした。

動物実験の計画及び実施に際しては国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施した。

C, D. 結果と考察

### 1) Germ-free の p53+/-マウスを用いた異物発がんの確認試験

無菌 p53 ヘテロ欠失マウス（C57BL/6N）に対してのガラスの板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行う試験を実施した。なお、対照群にはシャムオペレーションを実施した群を設定した。一群の動物数はガラス埋植群で 40 匹、シャムオペレーション群 35 匹で、それぞれ全動物の手術を 22 年度内に終了した。発がん性を観察中であるが、実験はおおむね終了した。そこで、前回実施したコンベンショナルな条件下で飼育したガラス板埋植マウスの異物発がんのデータと今回実施した germ-free の条件下で飼育したガラス板埋植マウスの発がん性を初発腫瘍確認日（皮下約 5mm φ 時点）を基に比較したところ、カプランマイヤー法による統計解析で有意な差は認められなかった（図 2）。また、腫瘍径 13mm 時点のデータを基に同様に検討したが、有意差は認められなかった。前回の実験と結果に差が生じた原因については、前回はコンベン

ショナルなマウスの実験結果から腫瘍サイズを基に、近似的に初発腫瘍発生時期を計算したものであり正確ではなかったことが考えられた。そこで、1 回目に実施された germ-free 群の初発腫瘍発生時期を2回目の germ-free 群から計算した。軽度ではあるが、germ-free 群で腫瘍発生時期が早くなる傾向が認められたが、有意差が認められた。逆に、2 回目に実施した germ-free 群の初発腫瘍発生時期を conventional な実験のものから計算してみると、軽度ではあるが germ-free 群で腫瘍発生が見かけ上遅延する結果が得られた(図 3)。以上より、1 回目と2回目で見かけ上結果が異なった原因の一つとして、1 回目では近似的に初発腫瘍発生時を算出したことが考えられた。

次に、初発腫瘍発生日に加えて、生じた腫瘍のサイズについて解析した。その結果、ウィルコクソンの順位和検定で、腫瘍サイズが有意( $p < 0.001$ )に germ-free 群で小さいことが明らかとなった。一方、腫瘍採取時期に有意差は認められなかった。この結果、「細菌環境」は腫瘍の発生よりも腫瘍サイズの増大に関与していることが示唆された(図 4、表 1)。

## 2) 術野の嚴重消毒と簡易消毒の異物発がん に及ぼす影響解析

術野の嚴重消毒と簡易消毒の異物発がん  
に及ぼす影響を SPF 条件下の雌 p53 ヘテロ  
欠失マウスを用いて比較した。その結果、  
ガラス板埋植により埋植部位に腫瘍が埋植  
後 25 週前後から発生したが、消毒法の違  
いによる腫瘍発生率を初発腫瘍確認日(皮

下約 5mm $\phi$ 時点)を基に間に比較したと  
ころ、有意な差は認められなかった(図 5)。  
また、腫瘍径 13mm 時点のデータを基に同  
様に検討したが、有意差は認められなかつ  
た(図 6)。しかし、生じた腫瘍のサイズに  
ついてウィルコクソンの順位和検定を行っ  
た結果、腫瘍サイズが有意( $p < 0.001$ )に嚴  
重消毒群で小さいことが明らかとなった。  
一方、腫瘍採取時期に有意差は認められな  
かった。この結果、消毒の嚴重度による「細  
菌環境」が腫瘍サイズの増大に関与してい  
ることが示唆された(図 7、表 2)。

## E. 結論

p53 $\pm$ -マウスを用いた異物発がん試験に  
おいて、germ-free マウスでは腫瘍サイズ  
がコンベンショナルな条件下で発生した  
腫瘍より有意に小さいことが明らかとな  
った。また、嚴重消毒では簡易消毒に比  
較して有意に腫瘍サイズが小さいことが  
明らかとなった。これらの結果、埋植材  
料の異物発がん実験において細菌環境の  
制御と術野の消毒処置の重要性が明らか  
となった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予 定も含む)

### 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

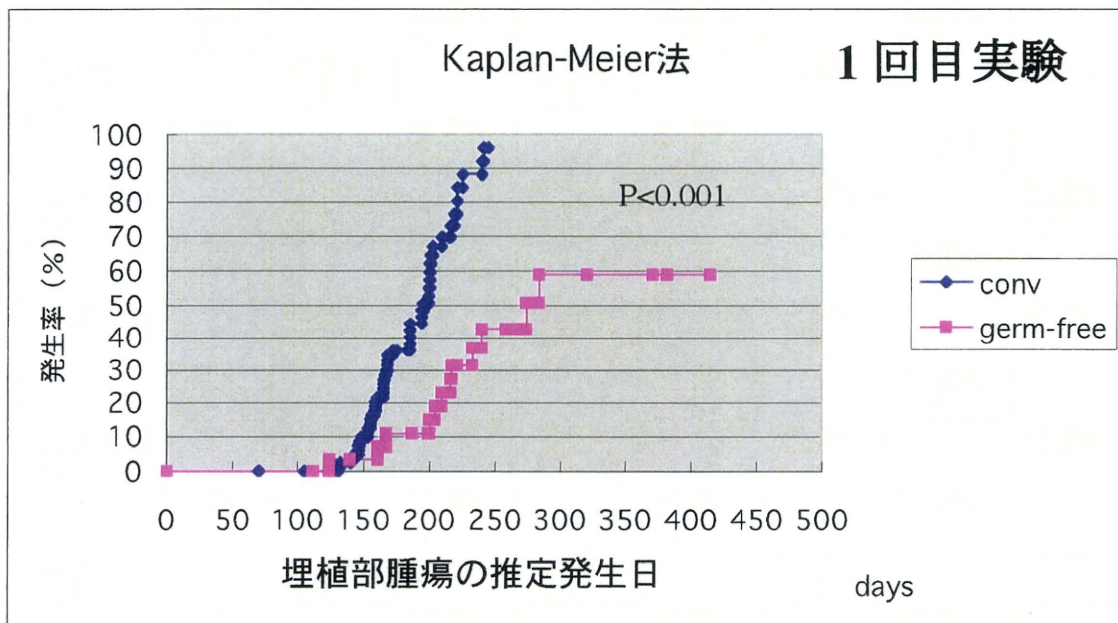


図 1. p53+/-マウスにおける conventional または germ-free 環境下での異物発がん性の比較

\* : germ-free 群の埋植部腫瘍推定発生日は conventional 群の解剖日の腫瘍径と腫瘍増殖速度を基に算出した。



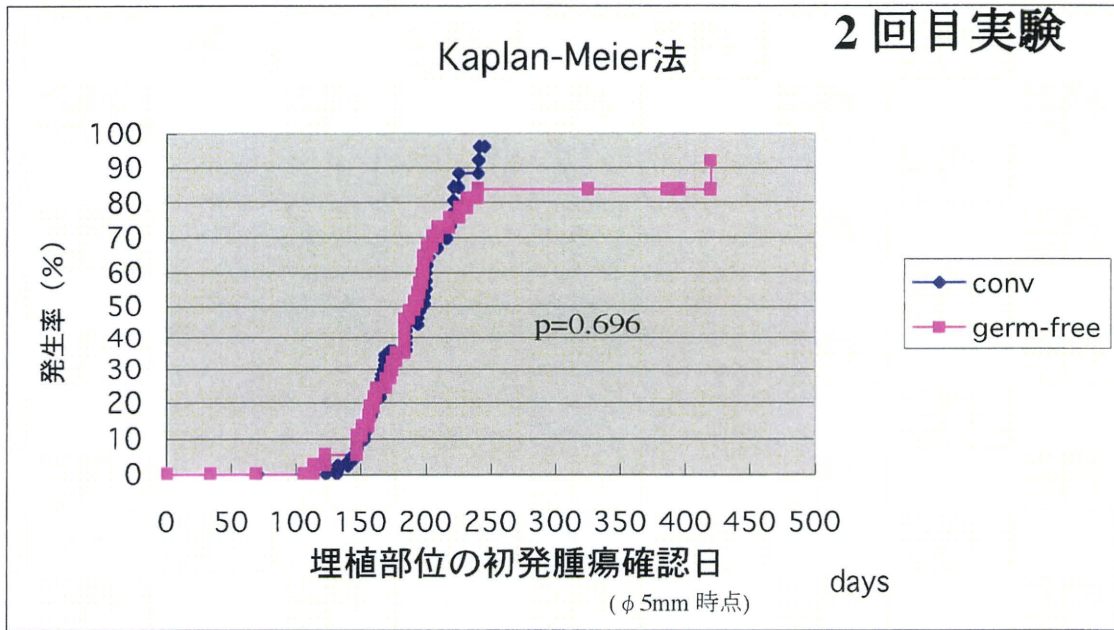


図2. p53+/-マウスにおける conventional または germ-free 環境下での異物発がん性の比較の追加実験

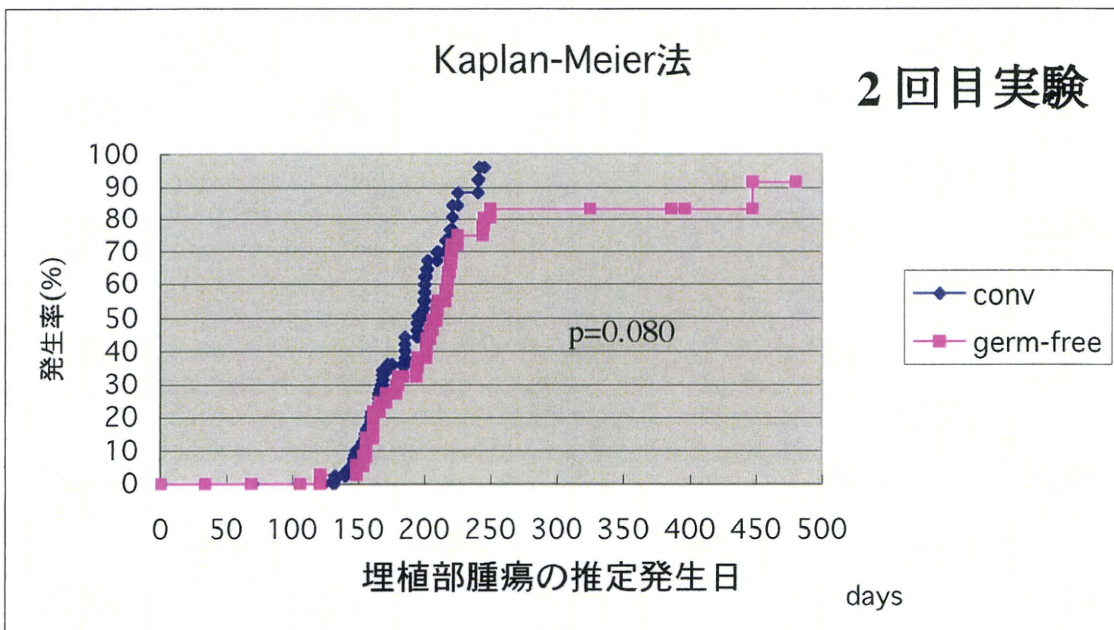
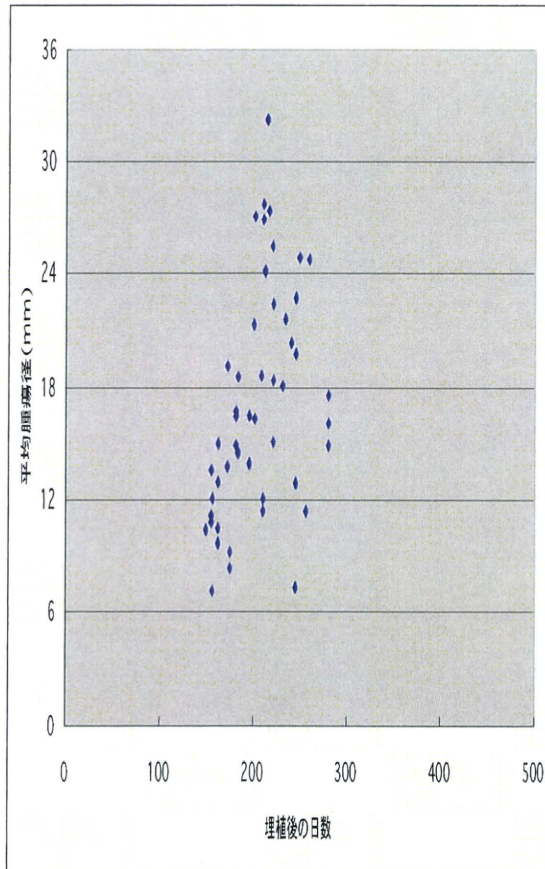


図3. p53+/-マウスにおける conventional または germ-free 環境下での異物発がん性の比較の追加実験

\* : germ-free 群の埋植部腫瘍推定発生日は conventional 群の解剖日の腫瘍径と腫瘍増殖速度を基に算出した。

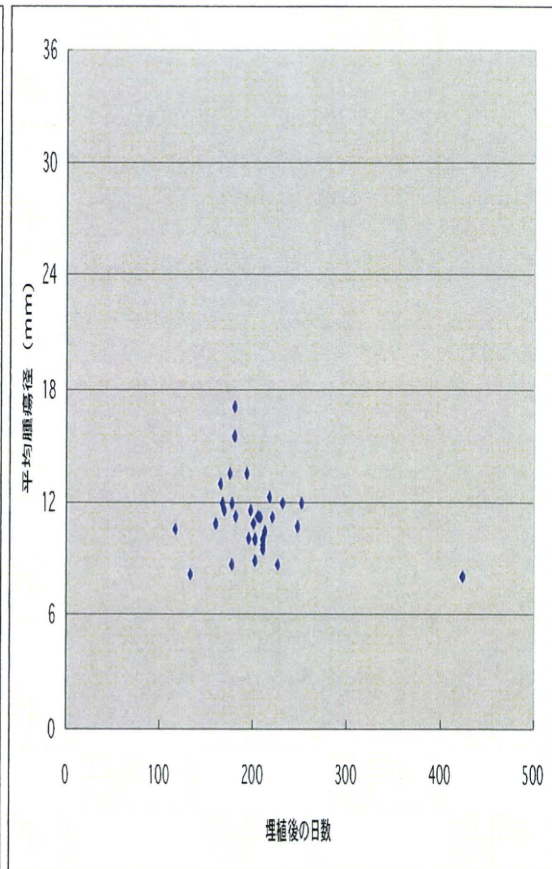


A) conventional マウス



平均腫瘍径  $17.0 \pm 6.1\text{mm}$   
解剖までの日数  $204 \pm 37$

B) germ-free マウス



平均腫瘍径  $11.1 \pm 1.9\text{mm}$  ( $p < 0.001$ 、  
順位和検定)  
解剖までの日数  $201 \pm 51$

図 4. p53+/-マウスにおける conventional または germ-free 環境下での埋植後の日数と埋植部位に発生した腫瘍の平均径の比較

A) conventional マウス、B) germ-free マウス

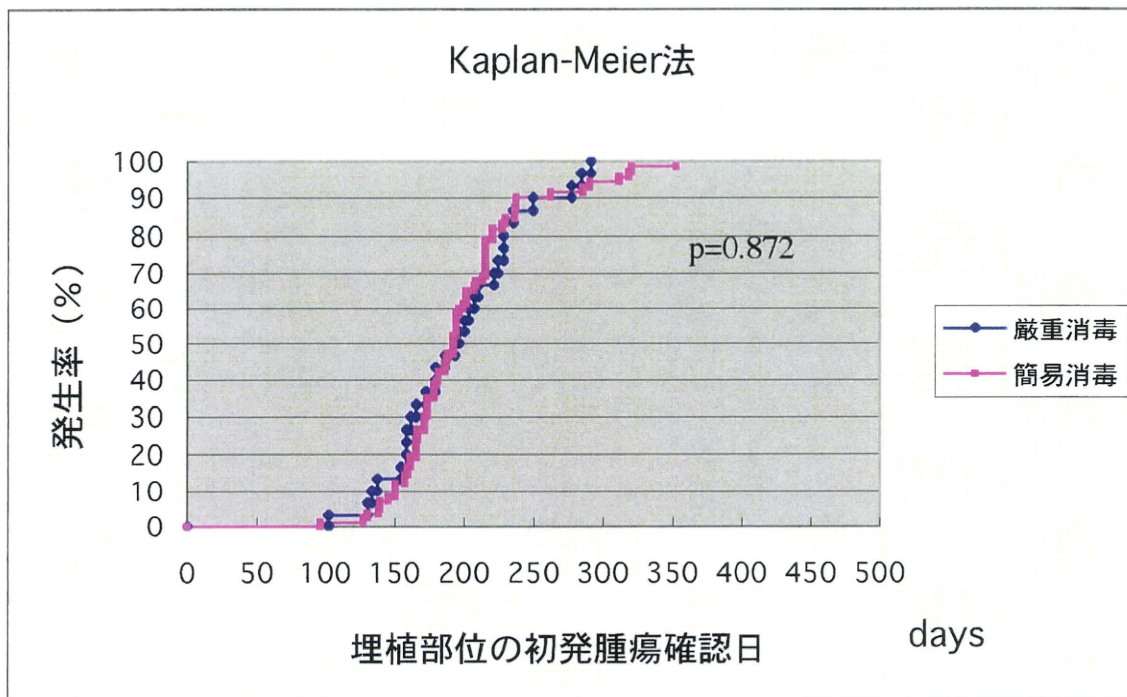


図 5. ガラス板埋植 p53+/-マウスにおける嚴重消毒と簡易消毒の異物発がん性の比較

\* : 初発腫瘍の径は約 5mm

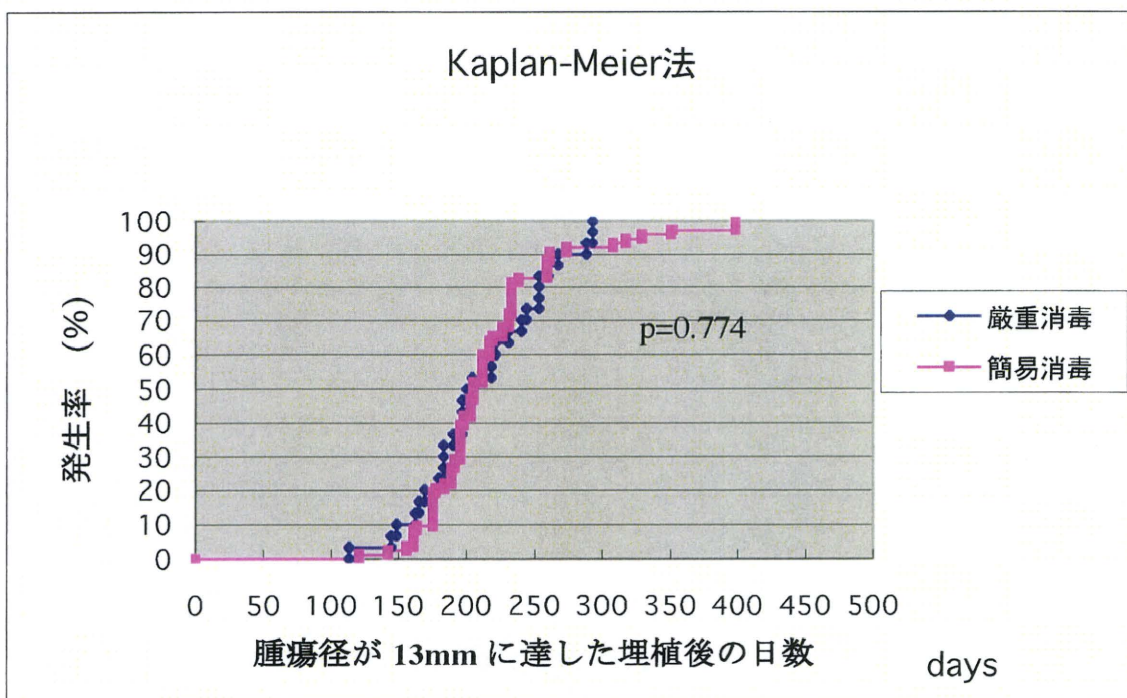


図 6. 上図を腫瘍径 13mm の値を用いてグラフを書き直した場合