

201408010A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

24時間機能可能な携帯型人工臓器の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹内 昌治

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
24時間機能可能な携帯型人工膵臓の開発	-----	1
竹内 昌治		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	21

2 4 時間機能可能な携帯型人工膵臓の開発

研究代表者 竹内 昌治 東京大学生産技術研究所 教授

研究要旨

本年度は携帯型人工膵臓の構成要素として重要な連続グルコース測定モジュールの開発に注力した。連続グルコース測定モジュールは①連続測定用グルコース応答性蛍光ゲルと②蛍光センサデバイスから構成される。

連続測定用グルコース応答性蛍光ゲルは、一定期間生体内に留置されるため、生体内留置における測定性能の安定性が課題となる。昨年度は生体内劣化の対策として、マクロファージ等が発する過酸化水素からの保護を目的としたカタラーゼ添加蛍光ゲルを作製した。本年度はカタラーゼ添加濃度設定を目的とした *in vitro* 性能評価と *in vivo* での効果検証を実施した。*in vitro* 評価では、2.0mg/ml 以上のカタラーゼ添加濃度により、過酸化水素による劣化からの保護効果が得られることが示唆された。また、同濃度以上でも、蛍光ゲルのグルコース測定性能が低下しない傾向が確認された。ラット背部へ1週間埋め込んだ生体内劣化評価では、カタラーゼ添加蛍光ゲルの方が無処理蛍光ゲルよりも蛍光残存率は高いとの結果を得た。しかし、本結果は *in vitro* の結果から予想される効果よりも小さいため、今後他の生体内物質による劣化からの保護なども検討する必要がある。安全性に関して、昨年度は細胞毒性試験を実施し、陰性対照群や非処理群と比較して有意な毒性はないとの結果を得た。本年度は生体内埋植を念頭に、ラットへの蛍光ゲル埋植による全身毒性評価（血液生化学的検査及び器官の病理検査）と局所刺激の評価（蛍光ゲル周辺組織の病理評価）を実施した。埋植期間は 7,14,28,60 日を設定した。全身毒性の評価では、設定した項目に対して異常値及び異常所見は無かった。局所刺激性の評価では、通常陰性対照として用いられるポリウレタンシートと比較しても刺激性が低いとの結果を得た。

蛍光センサデバイスの開発について、昨年度は光ファイバーを利用した反射型測定の原理確認機を作製し、麻酔下での動物実験において蛍光検出可能なことを確認した。本年度は、自由行動下ラットの測定へ向けて無線測定の安定化と耳へのファイバー固定方法について検討を進めた。無線測定の安定化では、定電流回路を実装し、標準蛍光板を用いた 24 時間測定で測定安定性を実証した。耳への固定には専用接着治具と歯科用セメントを利用し測定用光ファイバー先端と蛍光ゲルとの位置関係が変化しにくい固定方法を開発した。麻酔下糖負荷実験において、6 時間ほどは安定した測定が可能であった。ただし、ファイバーに外力が伝わると信号が不安定になるため、今後はファイバーとラットの頭が一体となって動くような方法を検討する必要がある。

分担研究者

興津 輝	東京大学生産技術研究所／特任教授
川原 圭博	東京大学大学院情報理工学系研究科 准教授
高橋 正幸	テルモ株式会社・医療器（テルモ㈱ホスピタルカンパニー）DM・ヘルスケア事業 R&D部門
大谷内哲也	テルモ株式会社・医療器（テルモ㈱ホスピタルカンパニー）バイスプレジデント

A. 研究目的

携帯型人工膵臓は膵β細胞の機能が完全に消失した患者の血糖値を24時間コントロールするツールとして期待されている。血糖をコントロールするためには、血糖値を常時モニタリングし、モニタリングした値に応じてインスリン投与量

を調節するシステムが必要となる。この常時モニタリングには連続グルコース測定モジュールが使われている。現在、針型電極センサを使用した連続グルコース測定モジュールが主流となっており、同タイプのセンサを利用して人工膵臓の開発が多く進められている。しかし、一般に針型酵素電極センサの測定精度はインスリン投与量を判断するツールとして充分ではない。また、センサシグナルが生体内で不安定のため、頻繁に自己血糖測定に用いる簡易血糖計による校正が必要となるため、血糖測定による負担も大きいといった課題がある。酵素電極型センサでの生体内不安定性の理由は測定原理上グルコースを消費するため低濃度で誤差が大きくなること、酵素が測定で消費されること等と言われている。そこで我々はグルコースを消費せず、酵素も使わない平衡反応を利用したグルコース応答性蛍光ゲルセンサを開発し、蛍光測定用検出装置と合わせた連続グルコース測定モジュールの検討を進めている。

本研究では、①グルコース測定モジュールの有

効性の検証②グルコースセンサの安全性の評価③蛍光センサデバイスの作製を実施した。昨年度、生体内劣化対策として検証を開始したカタラーゼ添加について、*in vitro*での濃度依存性評価と *in vivo*での抗劣化効果について検証を進めた。また、昨年度、安全性については細胞毒性試験を実施し、毒性がないとの結果を得た。本年度はラットを用いた全身毒性の評価と埋植部の局所刺激性評価を実施した。蛍光センサデバイスについては、昨年度構築した反射型測定装置の無線測定の安定化と耳への装置固定方法、埋込型無線測定装置の開発、麻酔下でのラットへの糖負荷実験について検討した。

B. 研究方法

B-1. グルコース応答性蛍光ゲルの有効性に関する開発

グルコース応答性蛍光ゲルの有効性を示すため、生体内安定性の向上（劣化対策）の検討に取り組んだ。劣化対策は昨年度から検討をしているグルコース応答性蛍光ゲルへのカタラーゼ添加を継続し、主に蛍光ゲルの保護効果と測定性能維持の観点から研究を進めた。

類似の蛍光物質で研究を進めているColvinらは生体内でマクロファージ等が放出する過酸化水素を生体内劣化の原因と捉えており、白金コーティングで対策をしている。本研究でもこれを検討したが効果が見いだせなかったため、別法としてカタラーゼの生体内での過酸化水素分解能に着目した。カタラーゼを添加した蛍光ゲルを作製し、過酸化水素溶液への浸漬に対する保護効果とグルコース測定性能のカタラーゼ濃度依存性を検証した。さらに、カタラーゼ添加蛍光ゲルをラットの背中に1週間埋植し、埋植前後における生体内劣化の差異についても評価した。

B-1-1. カタラーゼ添加ゲルの作製

カタラーゼ添加蛍光ゲルの作製には、以下の試薬を使用した。アクリルアミド (AAM) 15wt%、N,N'-メチレンビスアクリルアミド (Bis-AAM) 0.3wt%、過硫酸ナトリウム (SPS) 0.36wt%、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 0.2wt%、ポリエチレングリコール (PEG) 5wt%、S41 5wt%、リン酸ナトリウムバッファー (PB) (pH7.4) 60mM、EDTA 1mM、カタラーゼ、グルコース応答性蛍光色素 10wt%。

カタラーゼ添加蛍光ゲルは以下の手順で作製した。脱酸素のため、AAM、Bis-AAM 溶液を 10 分程度窒素バブリングし、蛍光色素、AAM、Bis-AAM、

PB、PEG、カタラーゼを水溶液中で混和した。なお、無処理蛍光ゲルについては、カタラーゼを混和せずに調整した。SPS、TEMED の順に上記水溶液に加えた。厚さ 1 mm のシリコンシートを 1 cm 角に切り抜いたシリコンシートをゲル作製の型とし、蛍光ゲル溶液を型の中に注いだ後 PET フィルムで蓋をし、上から 15 g の分銅でおさえた。サーモプレート（東海ヒット、TP-S、設定：36℃）の上に 30 分間放置した。室温に戻した後、ゲル化していないモノマーや架橋剤などを除去するため、milli-Q 水の交換を 3 回実施し、さらに milli-Q 水の中で 24 時間振とうした後、蛍光ゲルを取り出し実験に用いた。取り出した蛍光ゲルの写真を Fig. 1 に示す。カタラーゼは粉末状態で灰色をしているため、カタラーゼ添加蛍光ゲルは、無処理蛍光ゲルに比べ全体的に黒ずんでいた。

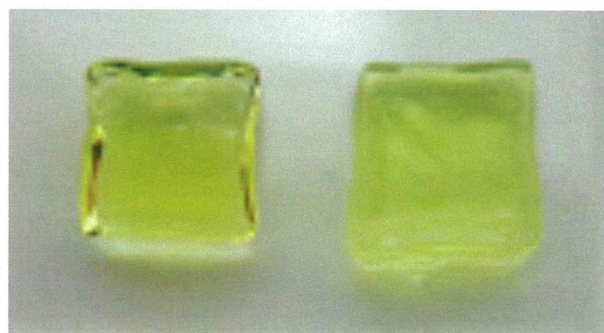


Fig.1 カタラーゼ添加蛍光ゲル（左）と無処理蛍光ゲル（右）の比較

B-1-2. *in vitro*における蛍光強度測定方法

蛍光強度測定は蛍光実体顕微鏡 (Carl Zeiss, STEREO Lumar) を使用した (Fig. 2)。上部にビデオカメラ (Panasonic, AG-HMC45) をセットし、取得した動画データから切り出した画像データを PC に取り込み、MATLAB (MathWorks) で作製したソフト上で、リアルタイム画像処理を行った。取得した画像群から励起光が照射された時間の画像群だけを抽出し、さらに、励起光が安定して照射された時間帯の画像 50 枚を選定した。測定時間は 1 秒程度で、測定間隔は 1 分とした。選定した各画像 (Fig. 3) に対し、蛍光発色部の数値を平均化した後、さらに時間軸で取得した 50 枚についての平均値を算出し、その値を *in vitro* の蛍光強度として用いた。



Fig. 2 蛍光強度測定実験系

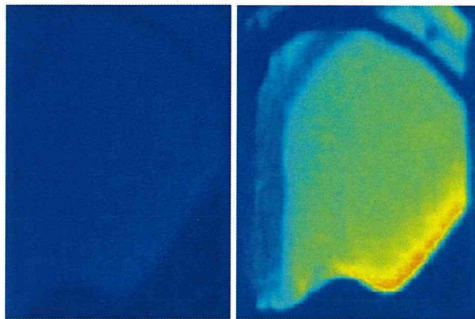


Fig. 3. 蛍光測定画像
(左 : 0 mg/dl 右 : 1000 mg/dl)

B-1-3. In vitroでのカタラーゼ濃度検討

カタラーゼ濃度検討のため、過酸化水素溶液浸漬における、蛍光保護効果及びグルコース測定性能に与える影響を調べた。本検討ではゲル作製時における、0.2, 0.6, 1.2, 2.0, 3.0 mg/dLのカタラーゼ添加濃度について実験を行った。コントロールとして、カタラーゼを加えていない無処理蛍光ゲルも作製した。実験は以下の手順で実施した。まず、B-1-1手順に従い、カタラーゼ添加蛍光ゲルを準備した。蛍光ゲルを生理食塩水と1000 mg/dLのグルコース生理食塩水溶液それぞれに浸漬させ蛍光強度を測定した。測定後、200 μ Mの過酸化水素溶液に24時間浸漬した。カタラーゼ添加ゲルに過酸化水素に浸漬すると、直ちに気泡の発生が確認された (Fig. 4)。これは、カタラーゼが過酸化水素を分解し、酸素が発生したためであり、蛍光ゲルに混合しても活性が保たれていた。24時間浸漬後、生理食塩水で洗浄し、浸漬前と同様に蛍光測定を行い、カタラーゼ蛍光ゲルの劣化対策能について評価した。

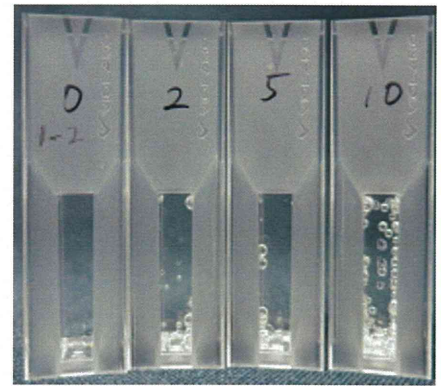


Fig. 4 過酸化水素浸漬により反応する様子 (左から0, 2, 5, 10mg/mlのゲルを底部に設置)

B-1-4. In vivoでの保護効果検証

In vitroでの蛍光劣化対策の、生体内での有効性を検証するため、ラット背部に蛍光ゲルを埋植し、埋植前後での蛍光強度の変化を調べた。本検討では、B-1-3の結果にて高カタラーゼ濃度でもグルコース応答性が維持されていることが示唆されたため、2.0, 5.0 mg/mLのカタラーゼ添加蛍光ゲルを使用した。B-1-3と同様に埋植前後で生理食塩水と1000 mg/dLのグルコース生理食塩水溶液の両方へ浸漬させ、蛍光強度を測定した。無処理蛍光ゲルとカタラーゼ添加蛍光ゲルを比較するため、1個体に対して両方の蛍光ゲルを1週間埋植した (Fig. 5, 6)。



Fig. 5 蛍光ゲルの埋植場所

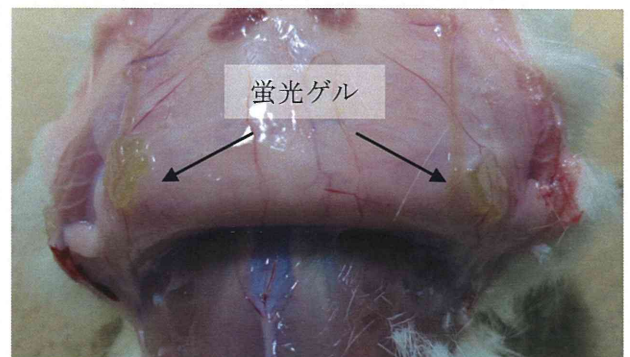


Fig. 6 埋植1週間後の蛍光ゲル

B-2. グルコース応答性蛍光ゲルの安全性に関する評価

連続測定用グルコース応答性蛍光ゲルは生体内に長期間留置する必要がある。現在日本で市販されている針型酵素電極センサは6日間連続した測定が可能であり、蛍光ゲルを用いたグルコースセンサについても、7日間以上の留置を見込んでいる。本研究では医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方(薬食機第0301第20号：平成24年3月1日付厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知)に基づき試験計画を策定した。本年度はスクリーニングとして①全身毒性及び②局所刺激性について調べた。

B-2-1. ラットへのサンプル埋植

①及び②の評価を同一個体で実施することとし、共通の情報等は以下の通りである。

ラット：S1c:SD (SPF)、雄、6週齢 ※1
室温：25±3℃
飼料：動物用固形飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社)
埋植期間：7, 14, 28, 60日 ※2
蛍光ゲル：B-1-1に記載の無処理蛍光ゲル作製に準ずる。円板状、直径6mm
投与量：1個(調製時の固化前液量として30μL)
/ラット
一般状態：休日を除き、1日1回以上観察し、体重を1回/週程度の間隔で測定、記録。
※1 蛍光ゲルはアクリルアミドをポリマー化する。モノマーのアクリルアミドは精巣への影響が知られているため、本検討では雄を選択した。
※2 急性期の毒性を調査するために埋植後7及び14日を埋植期間として設定した。埋植後の組織安定化後の評価として1ヶ月(28日)の埋植期間を設定した。さらに、検討実施が可能な最長期間として2ヶ月(60日)を設定した。

ラットへのサンプル埋植は以下の手順で実施した。まず、埋植前日にイソフルラン吸入麻酔剤下で背部被毛をバリカン及び除毛剤にて除毛した。埋植当日に4%イソフルラン吸入麻酔剤により麻酔導入、2%程度で麻酔を維持した。背部をイソジン液及びジヤームブロックで消毒後、背部左側を剪刀で切開し、鉗子にて皮下ポケットを作製した。検討試料をピンセットで皮下ポケットに挿入した。なお、陰性対照群については偽手術(皮下ポケット作製)を実施し(Fig. 7)、切開創はナイロン縫合糸で縫合した。



Fig. 7 蛍光ゲルの埋植場所

B-2-2. 血液生化学検査による全身毒性の評価

B-2-2-1. 採血方法

ラットを採血前日の夕刻から絶食させ、イソフルラン麻酔下にて開腹し、翼状針を使用して腹大動脈から採血した。この際、血清分離用と血漿分離用の2種類に分割して採取した。得られた血液の内、血清分離用は室温にて1時間放置、血漿分離用にはヘパリンナトリウムを混入して氷冷下にて保存した。その後、4℃、5000 G×10分で遠心し、血清あるいは血漿を分離した。分離した血清及び血漿は分析まで-80℃以下で凍結保存した。

B-2-2-2. 分析項目

分析項目については、「反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について(平成11年4月5日 医薬審第655号)」を参考に以下の項目を設定した。血漿蛋白、アルブミン、A/G比、蛋白分画、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ(AST、ALT)、アルカリフォスファターゼ、電解質(ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン)、CPK、γ-GTP。なお、実施は外部受託機関へ委託した。

B-2-3. 埋植部位の病理標本による局所刺激の評価

麻酔下にて全血採取後致死させた動物(B-2-2と同一個体)について各器官を肉眼的に観察した。皮膚(埋植試料を含む埋植部位及び偽手術側)、坐骨神経(片側)、精巣(片側)、精巣上体(片側)及び肝臓(外側左葉)について実施した。各標本はパラフィン包埋の後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡下で観察した。標本作成及び病理所見の作成は外部受託機関へ委託した。なお、原材料であるアクリルアミドでは、神経系の変性及び雄性生殖器への影響が報告されていることから坐骨神経及び精巣上体

B-3-2. 耳への装置固定方法

ラットの耳先端へ測定プローブを当て、安定的な測定を実現するためには、測定プローブ先端が蛍光ゲルの埋植されている部位と確実に接触すること、ラットが動いても接触面がズレないようにすることが必要である。これを実現するため、耳表面と測定プローブ先端が接する治具を作製した。以前の検討では、蛍光ゲル埋植部位はゲルの形状に沿って皮膚に凹凸ができるため、その凹凸形状に合わせた治具で測定を行っていた。しかし、これでは皮膚厚の違いによって治具を変更する必要があり、プローブ先端と蛍光ゲルの間に隙間が生じることがあった。そのため、治具と蛍光ゲルが接する面はフラットとし、蛍光ゲルとプローブ先端が必ず接するように変更した (Fig. 12)。また、当初は光ファイバーと耳を接合する治具だけのシンプルな構造としていたが、光ファイバー端面と蛍光ゲル埋植部に押し当てるのが困難であり、装着後に光ファイバーの位置調整ができないという問題があった。そこで、耳接着側の治具と光ファイバーを固定する治具を別体とした。耳接着側の治具は中心に空いている穴を利用して、上から中心位置の確認が可能となった。なお、従来の治具に比べ、2部品に分けたことでラットの動きによる部品間のズレが生じやすくなることが予想されたため、治具の周りには歯科用セメントで固定を施した (Fig. 13)。

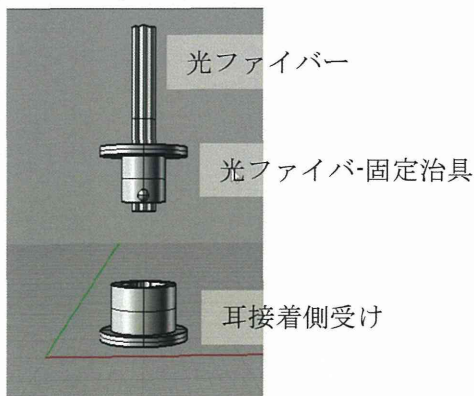


Fig. 12 測定プローブ用治具概略図



Fig. 13 歯科用セメントでの装置固定

B-3-3. ラットへの麻酔下糖負荷実験によるグルコース測定モジュールの検証

B-3-2で確立したラットの耳への蛍光センサデバイスの固定化手法を用い、麻酔下におけるラットの血糖値変化に対し、連続グルコース測定モジュールの有効性を検証した。

予め、頸静脈にTPC15カテを挿入し、ハーネスを装着後、ケージの中で回復飼育を行ったラットを測定に用いた。炎症などの影響を考慮し、測定の前週間に厚み1 mm×2 mm×10 mmの大きさの蛍光ゲルを耳介に埋植した (Fig. 14)。

麻酔下糖負荷実験時の全体像をFig. 15に示す。測定直前に動物にイソフルラン麻酔をかけ、測定期間中はラットが覚醒してしまわないように、呼吸数 70 ± 10 回/min程度を目安にイソフルラン濃度を管理した。この麻酔手法は、幼齢マウスへの吸入麻酔装置の開発として *Journal of Neuroscience Methods*, 2015, 243, 63-7にて報告した。

血糖値に関しては、血糖値の制御のプロトコルを利用し、5分おきに尾静脈から採血を行い、AccuChek (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) を用い測定した。測定直前にラット体重を計測し、ラットの体重に対しプロトコルに従い、40 mg/kg/minの速度でカテーテルからシリンジポンプを用いて1000 mg/dLグルコース溶液を投与することで、血糖値を400 mg/dL程度まで上昇させ、高血糖状態を維持させた。それに伴う、耳に埋植したグルコース測定モジュールの応答性を評価した。

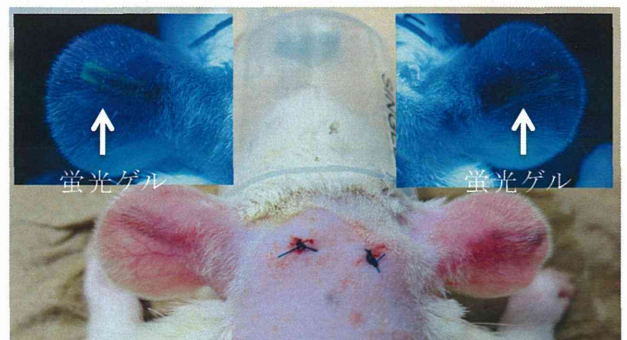


Fig. 14 耳への蛍光ゲルの埋植



Fig. 15 麻酔下糖負荷実験の全体像

B-3-4. 小型埋込型無線デバイスの開発

自由行動下ラットへの24時間の連続測定を実施していく上で、ラットへの負担、測定の長期安定性の相反する二つの性質を考慮すると、測定装置は測定精度を落とさずに小型化することが求められる。また、同時に高い定量性も求められるため、測定部位と蛍光ゲルを生体に埋め込む、完全埋込型の小型無線デバイスの検討を行った。回路の設計図および原理試作機を (Fig. 16, 17) に示す。

計測器は25 mm×41 mmの無線送信部位と、5.2 mm×5.6 mmの測定部位から構成される。測定部はLEDとしてBivarのSM1206UV-405-ILを、光検出器としてAvago technologiesのAPDS-9005を使用した。無線送信部位には小型のIEEE802.15.4/ZigBee無線モジュールである東京コスモス電機のTWE-Liteを用いた。

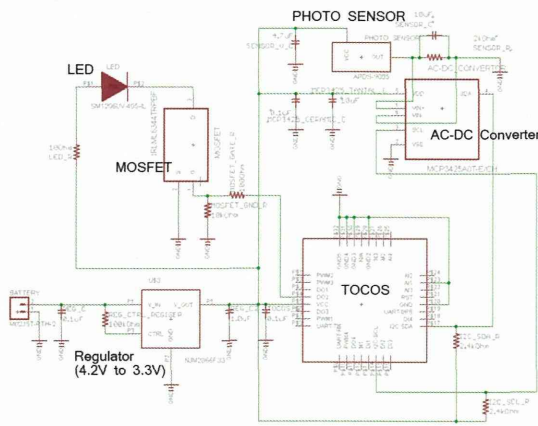


Fig. 16 小型埋込型無線デバイスの回路図

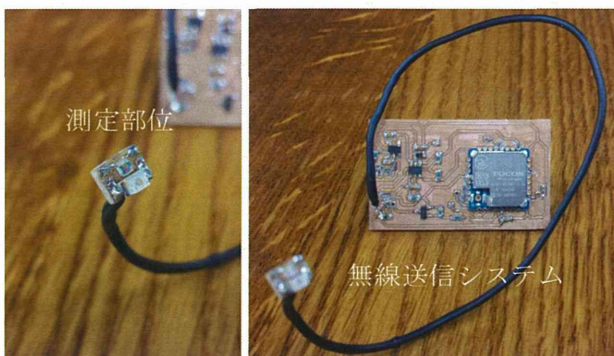


Fig. 17 小型埋込型無線デバイスの試作機

蛍光ゲルの蛍光を検出器の受光部で受光させることで光の強度に応じた電流を発生させ、これを16bit AC-DCコンバータを用いて離散値に変換した値をTWE-Liteで読み取り、無線通信を介してPC上に送信し、計測値を収集した。測定安定性の評価のために、標準蛍光板に測定プローブの先端を設置し、1秒ごとに励起光照射と蛍光測定を行い、10時間連続測定における測定値の変動を調べた。

C. 研究結果

C-1. グルコース応答性蛍光ゲルの有効性に関する開発

C-1-1. カタラーゼ添加ゲルの蛍光機能

カタラーゼ添加をした蛍光ゲルのグルコース測定能が変化しているか調べるため、ベースライン(生理食塩水に蛍光ゲルを浸漬した時の蛍光強度)の変化とグルコース応答性(1000 mg/dLのグルコース溶液に浸漬した蛍光ゲルと生理食塩水に浸漬した蛍光ゲルの蛍光強度の差分)のカタラーゼ添加濃度依存性について、無処理の蛍光ゲルをコントロールとして比較した。ベースラインの比較についてをFig. 18に、グルコース応答性についてをFig. 19に示した。

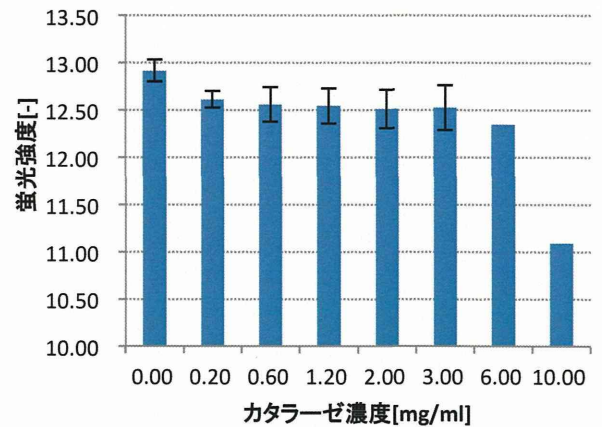


Fig. 18 ベースライン比較

※0~3.00mg/dl : N=3, 6, 10mg/dl : N=1

Fig. 18に示すように、カタラーゼ添加濃度とベースライン蛍光強度には負の相関があった ($r=-0.73$)。0.2 mg/mlのカタラーゼ添加で0.7 (5%) ベースラインが下がり、その後濃度依存的に-0.12 (蛍光強度) / (mg/dL) で下がる傾向があった。ベースラインが下がる理由としては、カタラーゼの粉末が灰色を呈するため、添加量の増加により蛍光ゲルの黒ずみが強くなってしまふ。つまり、カタラーゼの光の吸収により、蛍光色素に届く励起光の光量が下がることで、蛍光強度が

減少してしまい、ベースラインがカタラーゼの添加濃度の上昇とともに、線形的に下がったものと示唆された。

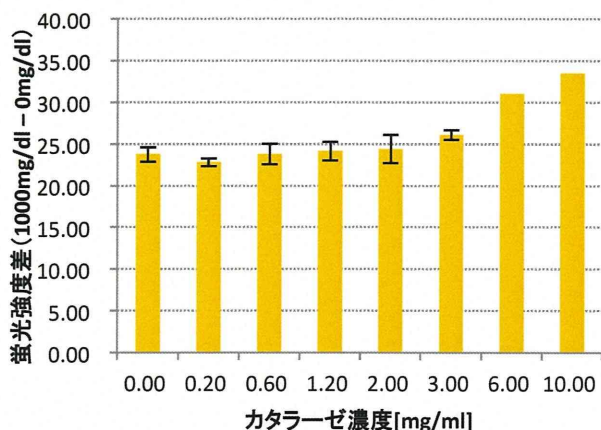


Fig. 19 グルコース応答性
 ※0~3.00mg/dl : N=3, 6, 10mg/dl : N=1

一方、Fig. 19に示すようにカタラーゼ添加濃度とグルコース応答性の間には正の相関があった(0.98)。グルコース応答性は、0.6 (蛍光強度) / (mg/dL) の関係で濃度依存的に蛍光強度が上昇した。蛍光強度が上昇した原因としては、カタラーゼ添加による蛍光ゲルの内部構造の変化によって、蛍光団周辺の環境が変わったためと示唆される。以上の結果から、カタラーゼ添加による蛍光ゲルの影響が少なからず存在することを示しており、グルコース濃度に対する応答性を確かめる必要がある。

C-1-2. 過酸化水素溶液浸漬前後の蛍光強度の変化

Colvinらは、過酸化水素による蛍光色素の劣化機構として、蛍光色素のボロン酸基が酸化されフェノール基となり劣化を引き起こす機構を報告している。そのため、蛍光色素が劣化するとグルコースへの応答を示さなくなり、蛍光強度が低下してしまう。そこで、カタラーゼ添加蛍光ゲルを過酸化水素溶液に24時間浸漬し、浸漬前後での蛍光ゲルの1000 mg/dLグルコース溶液中での蛍光強度の変化を調べ、劣化対策の効果を検証した。測定結果をFig. 20に示す。

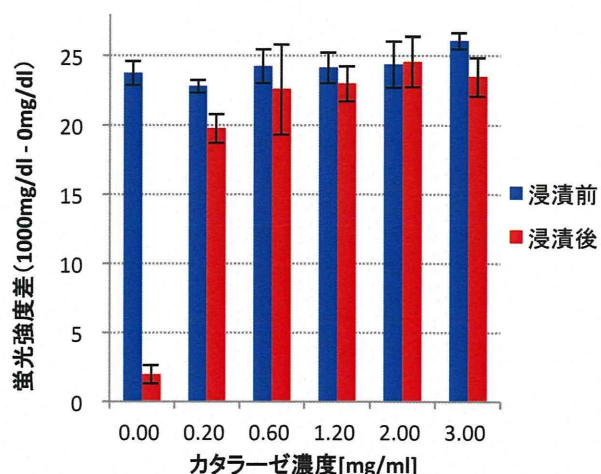


Fig. 20 過酸化水素浸漬前後の蛍光強度差

無処理の蛍光ゲルでは、過酸化水素溶液への浸漬により、ほとんどグルコース応答性を失ってしまった。一方、カタラーゼ添加をした蛍光ゲルでは、浸漬後の蛍光強度の低下が緩和されており、2.0 mg/mlのカタラーゼ添加で、浸漬前後の蛍光強度にほぼ差が無かった。しかし、3.0 mg/mlの結果については浸漬後の蛍光測定値は浸漬前の蛍光測定値よりも低くなっているが、2.0 mg/mlと有意な差ではなく、2.0 mg/ml以上でカタラーゼによる過酸化水素の分解がほぼ飽和すると考えられる。

C-1-3. 生体内埋植による劣化対策の評価

C-1-1,2の結果より、in vitroでは2.0 mg/ml以上のカタラーゼ添加によって、蛍光ゲルに過酸化水素からの保護効果を付与できることを示した。そこで、本項では2.0 mg/mlと5.0 mg/mlのカタラーゼ添加を行った蛍光ゲルを使用し、in vivoにおいて、in vitroでの劣化対策の効果を検証した。5.0 mg/mlのカタラーゼ添加ゲルを用いたのは、カタラーゼ自体生体内で分解されることも考えられ、予め高いカタラーゼ濃度の方が劣化対策の十分な効果を得られる場合もあると考えたからである。

ラット背部埋植前後の蛍光ゲルの蛍光強度を比較した結果をFig. 21に示す。無処理蛍光ゲルでは、埋植後に蛍光強度は半分程度になった。カタラーゼ添加ゲルにおいても、無処理蛍光ゲルと比べると蛍光強度が維持されていたが、蛍光強度は低下してしまっていた。実際、埋植前後での蛍光残存率を計算すると、無処理蛍光ゲルは43%、2.0 mg/mlは61%、5.0 mg/mlは58%となった。この値から、5.0 mg/mlは2.0 mg/mlのカタラーゼ添加と効果に差がないと考えられる。

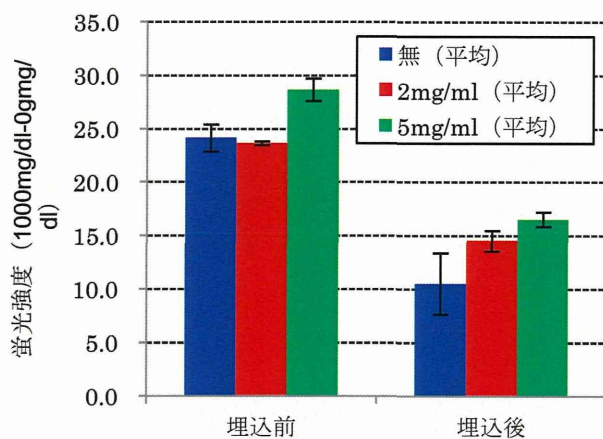


Fig. 21 埋植前後の蛍光強度差

C-2. グルコース応答性蛍光ゲルの安全性に関する評価

C-2-1. 血液生化学検査による全身毒性の評価

血液生化学検査の結果を添付資料 (P. 14~16) に示す。全ての結果について、特に異常値は認められなかった。TGが全体的に少し低い値であるが、TGは食事の影響を受けやすく、術前の絶食の影響が出た可能性が高い。また、GLUは全体的に高めの値となっているが、これは使用した麻酔の影響によるものである。予備実験にて、麻酔時間と共に血糖値が200 mg/dL付近まで上昇することを確認した。以上より、本研究で開発を進めるグルコースセンサの全身毒性は低いことが示された。

C-2-2. 埋植部位の病理標本による局所刺激の評価

病理標本の外部機関報告書を添付資料 (P. 17~19) に示す。ラット皮下埋植試験 (GLP試験) では、対照材料 (ポリウレタンシートのみ) の埋植1週間後の結果、試料は蛍光ゲルは材質が柔軟なこともあり、刺激性が極めて少ないものと考えられる。

以上より、本研究で開発を進めるグルコースセンサの局所刺激は極めて低いことが示された。

C-3. 蛍光センサデバイスの開発

C-3-1. 無線デバイスの測定安定性

定電流回路導入による測定安定性の効果を調べるため、標準蛍光板を用い、連続測定した結果をFig. 22に示す。本回路導入以前は、24時間の連続測定で蛍光強度の値が100以上上昇してしまっていたが、定電流回路の導入により、SDが0.42と安定

した測定結果を得られた。本結果より、24時間の安定した連続測定ができることを確認した。

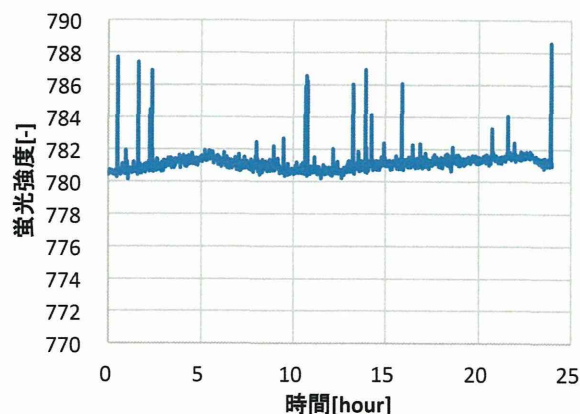


Fig. 22 標準蛍光板24時間測定結果

本デバイスを用いて蛍光ゲルを24時間連続測定した結果をFig. 23に示す。標準蛍光板測定ではほとんど変動しなかったが、蛍光ゲル測定では261~266まで徐々に上昇した。傾きは0.14 (蛍光強度) / (時間) であった。この傾きによる補正をした場合のSDは0.25となり、標準蛍光板と同等の値が得られた。

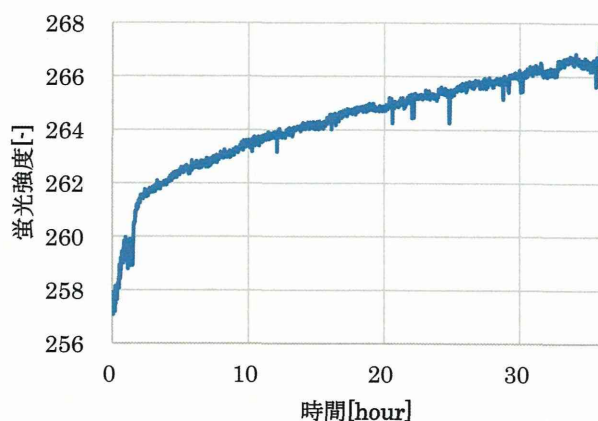


Fig. 23 24時間蛍光ゲル測定結果

上述したように装置自体の測定安定性は標準蛍光板測定で確認できていることから、この変動については、蛍光ゲルの特性変化や蛍光ゲルの固定位置が徐々にズレてしまったことが予想される。ラット耳介へプローブ先端を固定し、120分連続測定した結果をFig. 24に示す。C-3-1の結果と比較して測定値が低いのは、励起光と蛍光共に皮膚で散乱、吸収されてしまうからと考えられる。120分間で血糖が146~130 mg/dLへ徐々に落ちたが、測定値も徐々に下降する傾向がみられた。な

お、今回実施した実験では、血糖値を上昇させる
ところまで至らなかったため、この値の変動が実
際の血糖変動を反映しているかどうか確認を得
ることはできなかった。ただし、本実験により、
皮膚のように様々な反射吸収が想定される状況
でも、ラットが動かなければ安定して測定でき
る可能性を得られた。

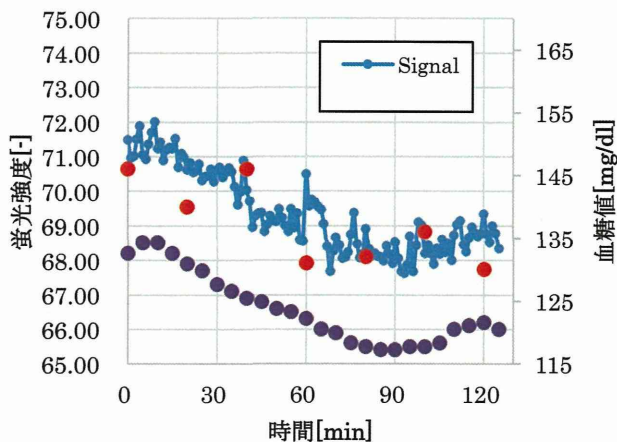


Fig. 24 麻酔下連続測定結果

次に、自由行動下ラットでの測定を想定し、フ
ァイバーに外力が働いた場合における測定値へ
の影響を調べた。ラットの動きを模した影響と
して、セメントで固定したファイバーに対し上下
左右に力を加えた際の蛍光強度の変化ををFig. 25
に示す。本検討によると、耳とファイバーが一
緒に動く際はほとんど値が変動しないが、ファ
イバーだけが引っ張られる場合、値が大きく変
動してしまった。これは、耳とプローブ先端の
距離や位置関係がズレることで、蛍光ゲルと
の距離、皮膚の厚さの変化による吸収や散乱
の強度が変わってしまったことに起因すると考
えられる。

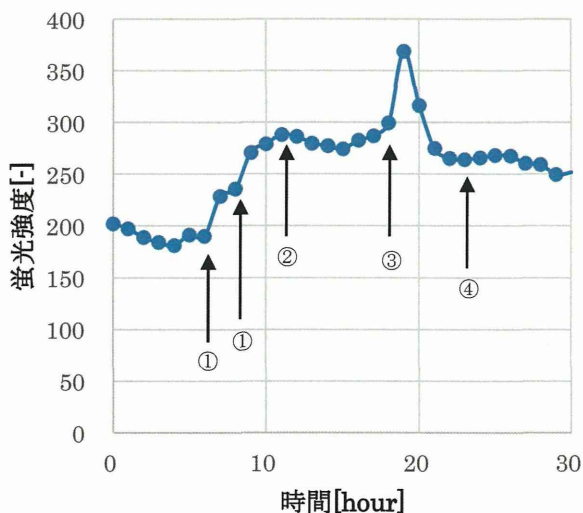


Fig. 25 ファイバーのズレによる値の変動

※①ラット前後にファイバーを寝かせる、②ファイバーを引っ張る、
③ファイバーを押しこむ、④耳とファイバーを同時に動かす

C-3-2. 反射型測定装置を用いたラットへの 麻酔下糖負荷実験

グルコース測定モジュールの有効性を検証す
るために、麻酔下のラットに対する糖負荷実験
の結果をFig. 26に示す。測定開始からの経過時
間を横軸に取り、縦軸には、グルコース測定モ
ジュールでの蛍光強度の変化と、コントロールと
してAccuChekを用い、尾より採血した実際の血
糖値をそれぞれプロットした。

また、測定中のイベントについてグラフ中に
書き込んだ。まず、始めの3時間は測定器が安
定するまで暖機運転を行い、測定器のバックグ
ラウンドとし、ラットの血糖値の正常値を計測
した。その後、シリンジポンプを用いグルコース
溶液をラットの体重に対して40 mg/kg/minの速
度で投与した。

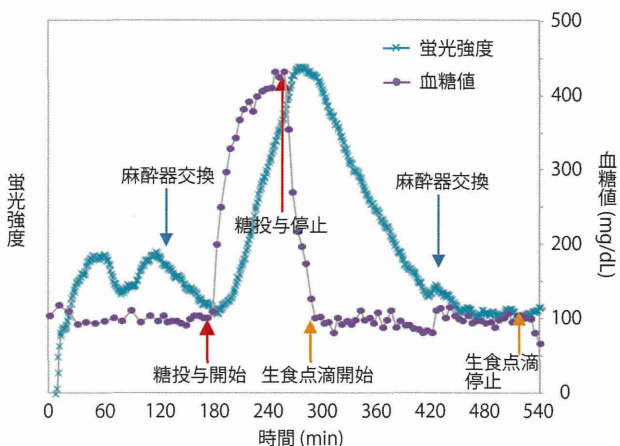


Fig. 26 麻酔下糖負荷実験

血糖値は、グルコース溶液の投与直後から直
ちに上昇し、30分程度で400 mg/dL以上とな
った。グルコースを投与し続け、400 mg/dL
以上の高血糖状態をさらに30分維持した後、
投与を停止した。血糖値が正常値まで下が
ったところで、ラットの脱水を防ぐため生理
食塩水の点滴を開始した。

グルコース測定モジュールの応答性として
は、グルコース投与開始6分後に蛍光強度の
増大が確認された。しかし、実際の血糖値
の上昇に比べ、蛍光強度の増大は緩やかで
あった。また、グルコース投与停止してか
らもしばらくは蛍光強度が上昇し、30分
ほど遅れて蛍光強度の減少が始まった。血
糖値の減少に伴う、蛍光強度の減少は、
上昇の時よりもさらに遅く、蛍光強度

が下がりきるまでには、実際の血糖値が正常値に落ち着いた後、120分近く遅れて観察された。

(倫理面の配慮)

本研究での動物実験は東京大学における動物実験実施規則に則り、動物実験専門委員会の承認の下に行っている。

D. 考察

D-1. カタラーゼによる蛍光ゲル保護効果が *in vivo*、*in vitro* で差が生じた理由について

In vitro で用いた過酸化水素濃度は、一般に人で測定される濃度の10倍程度の濃度で劣化の有無を評価した。得られた結果は2 mg/mlのカタラーゼ添加をすることで、劣化の影響を受けないはずであったが、*in vivo* の結果では半分程度に落ちてしまった。この理由としては、次の三つが考えられる。一つ目は、劣化の主な原因が過酸化水素以外の物質によることである。本研究では、炎症に関わるマクロファージや好中球といった細胞が産生する過酸化水素が蛍光ゲルのポロン酸基を酸化し、フェノール基に変換してしまう機構を受けて、検討を進めた。しかし、生体内には他にもラジカル種(スーパーオキシド、過酸化脂質など)があることから、それらにより蛍光色素が劣化してしまっただけとも考えられる。カタラーゼは過酸化水素に対し特異的に反応し、他のラジカル種に対しては効果がない。今後、生体内で発生すると考えられる他のラジカル種に対しても保護できるような酵素や化合物、もしくは蛍光色素自体に耐ラジカル性を付与するように改良する必要がある。二つ目の可能性としては、生体内でカタラーゼが溶出・分解してしまい、時間経過と共にゲル中のカタラーゼ量が減少してしまい、十分な量のカタラーゼが蛍光ゲル中に残っていなかった可能性が考えられる。これについて、カタラーゼ添加蛍光ゲルのカタラーゼの残存量や活性についての埋植前後で比較や、溶液内に放置した場合の蛍光ゲルからのカタラーゼの溶出量を検討することで明らかになる。三つ目の理由としては、カタラーゼの酵素活性が7日間保持できなかった可能性がある。*in vitro* 実験では24時間過酸化水素溶液に浸漬したが、埋植では7日間絶えず溶液の交換が進み、過酸化水素に晒されることになる。今回の検討では、カタラーゼ活性の7日間にわたる経時変化を考慮していなかったため、*in vitro* の結果が *in vivo* に反映されなかったと考えられる。本検証については、*in vitro* で過酸化水素水を交換しながら、7日間過酸化水

素に浸漬し、蛍光強度の経時的な変化を評価することで明らかにできる。なお、カタラーゼ活性は経時的に低下すると予想されるため、本検討で用いたカタラーゼ濃度よりも高い濃度で実験する必要がある。カタラーゼ濃度を高くする場合、グルコースへの蛍光ゲルの応答性が変化する可能性があり、グルコース応答性の維持と過酸化水素からの保護が両立するような濃度設定を行う必要がある。

D-2. 安全性評価について

本研究で開発を進めるグルコースセンサは一度埋め込んだら一生使えるようなものではない。センサの寿命に応じて入れ替える必要がある。本研究では単回使用での安全性に関する知見は得られたが、繰り返し暴露に対する影響までは考慮できていない。免疫反応は2回目の暴露で反応が大きく出ることもあるため、繰り返し暴露に対する評価は今後必要になるだろう。なお、新規物質である蛍光物質の安全性が未知であったが、今回の検討でも特に異常は観察されず、昨年度実施した細胞毒性試験でも毒性が認められなかったため、毒性の高い物質ではないと考えられる。今後、劣化対策で追加の処理を施す必要性が高い。今回の検討で用いたゲルは劣化対策前の蛍光ゲルであるため、最終仕様の製品形態で行う必要がある。

D-3. 蛍光強度評価方法について

本研究の *in vitro* における蛍光ゲルの蛍光強度測定では三つの課題が存在する。一つは、蛍光強度として算出される値は画像全体の平均値であり、局所的なゲルの劣化を評価することができない。これは、画像として蛍光強度を取り込み、輝度の分布・変化を解析するアルゴリズムを開発することで解決できる。二つ目は蛍光ゲルの位置が、必ず同じ位置にセットするのは難しく、測定ごとにズレてしまう点である。これは、一つ目の問題と同様に画像としてデータを取り込み、ゲルの形状に異方性を持たせ、ゲル内の場所を座標として評価できるプログラムの開発で解決することが可能である。また、フローの中での観察も考えられるので、自発光の少ない素材で新しい治具を開発する必要がある。三つめは、完全に劣化して値が消失した領域を評価できていないことである。今回の計算方法では、蛍光が発せられている領域のみを算入対照としている。よって、劣化が進んでほとんど蛍光を端ない領域がある場合、そこは計算から外れる。特に蛍光ゲルの端は

その影響を受ける可能性が高い。この課題に対しても画像処理によって解決することが可能であると考える。

D-4. 測定プローブの固定方法について

今回検討した歯科用セメントでは、耳の固定は十分ではないことが示唆された。特に、ファイバーが引っ張られる方向には弱いことが分かった。現在の自由行動下ラット測定モジュールは光ファイバーを上方から引っ張る構造になっているため、ラットの動きで測定値がズレる可能性が高い。今後の解決策として、ラットの頭頂部にファイバーを固定し耳へファイバーの先端を近づける方法か、測定部位と蛍光ゲルを併せて埋植する完全埋込型がある。前者では、ラットの動きに対して頭頂部の固定に力がかかるため、ファイバー先端が引っ張られる可能性が少ない。また、後者では、現在皮膚の薄さから耳への埋植を行っているが、完全埋込型ならば耳以外の部分にも埋植が可能になり、より自由度が広がると考えられる。

D-5. 麻酔下糖負荷実験について

本研究では、血糖値制御下の自由行動下ラットに対する糖負荷実験によって、グルコース応答性蛍光ゲルを用いた連続グルコース測定モジュールの有効性を示す事を目標としている。そのために、麻酔下での糖負荷実験で、高い応答性かつ定量的な測定技術を確立することが求められる。

本年度遂行した麻酔下糖負荷実験の結果において、実際の血糖値に対する、蛍光強度の増減の遅れと定量性が課題である。蛍光強度の遅れについては、二つの課題があると考えている。一つ目はゲルの周囲の血流が悪くなっており、血管から間質液中へのグルコースの交換速度が遅くなっている事が示唆される。今後は、耳以外の埋植部位、例えば背部や側腹部などへの埋植も検討し、より間質液の交換がスムーズに進む埋植部位を選定する必要がある。二つ目として、ゲル自体の形状にある。本研究では、厚さ1mmの短冊状の蛍光ゲルを用いているが、ゲル内のグルコースの拡散に時間がかかり、蛍光色素のグルコース応答に遅れが出ていることが示唆される。ゲルの厚みを薄くしたり、側面に穴を開けたりすることで、ゲル中でのグルコースの拡散効率を向上させる必要がある。

また、定量性については測定装置の改良と蛍光ゲルの劣化対策によって解決すると考えている。現在の反射型測定装置の場合は、埋植した

ゲルと測定部位間の皮膚組織の厚さによって蛍光強度が変わる。定量的な評価を行うためには、蛍光ゲルに内部標準を埋め込む必要がある。一方、測定部位と蛍光ゲルを埋植する完全埋込型の場合は、内部標準の必要がない。その場合、測定部位の防水加工及び小型化が必要になる。また、絶えず蛍光ゲルが劣化し続けてしまうと蛍光強度から定量的な評価をすることは困難である。その解決法としては、蛍光ゲルの劣化をアルゴリズムとして蛍光強度の解析プログラムに組み込む方法か、D-1で考察した蛍光ゲルの劣化対策を行う事で、キャリブレーション頻度の少ない、連続グルコース測定モジュールの開発が可能となる。

E. 結論

本年度は、グルコース応答性蛍光ゲルの測定安定性向上と埋植安全性の評価、蛍光センサデバイスの開発を実施した。測定安定性の向上については、昨年度から引き続きin vitroではカタラーゼ添加による安定性の向上を検討し、in vivoでもカタラーゼ添加により安定性が向上することが示唆された。しかし、その効果は連続測定を実施するのに充分ではなく、今後、in vivoとin vitroの結果に差異が生じる理由を検討し、課題の解決を図る必要がある。埋植安全性の評価では、全身毒性及び局所刺激性共に影響が低いとの結果を得られた。ただし、これは現時点の組成での評価であり、最終組成にてもう一度行う必要がある。測定装置は無線での安定した測定を確認し、耳への固定方法に関する考察を得ることができた。自由行動ラット測定と定量的な測定に向けて、埋植部位の選定、測定装置の改良を行っていく必要がある。次年度へ向けては本年度の結果を元に評価の遅れている測定精度の検証を進める。既存の連続グルコース測定モジュールと比較することで、本測定モジュールの有効性を示していく。

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋正幸, 竹内昌治, “体内埋め込み型バイオセンサとバイオマテリアル”, バイオマテリアル学会誌, 日本医学館, 2014

Sachine Yoshida, Yuya Morimoto, Taishi Tonooka, Shoji Takeuchi: “An inhalation anesthetic device for stereotaxic operation on mouse pups”, Journal of Neuroscience Methods, 2015, 243, 63-7,

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

竹内昌治，柴田秀彬，川西徹朗：蛍光ハイドロゲルビーズおよびそれを用いた体内埋め込み用の糖類測定用センサー，特願2009-145640. 国立大学法人東京大学，テルモ株式会社，特許登録済

許允禎，竹内昌治，松永行子，柴田秀彬，川西徹朗，興津輝：蛍光ハイドロゲルおよびその製造方法、ならびにそれを用いた糖類測定用センサー，特願2011-214500，PCT/JP2011/070389，テルモ株式会社，国立大学法人東大学，技術研究組合B EANS 研究所，2010/9/30→2011/9/7 PCT:審査請

求中

高橋正幸，竹内昌治，興津輝：検知装置および検知方法，特願2012-155082，国立大学法人東京大学，テルモ株式会社，未審査請求

高橋正幸，竹内昌治，興津輝：アナライト分析装置、アナライト分析システム、およびモニタリング方法，特願2013-198614，国立大学法人東京大学，テルモ株式会社，未審査請求

2. 実用新案登録E

該当なし

3. その他

該当なし

血液生化学検査結果：7日間埋植

Animal No.	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	CPK (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	ALP (IU/L)	T-CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	T-BIL (mg/dL)	GLU (mg/dL)	BUN (mg/dL)	CRNN (mg/dL)
7-1	59	31	398	0	1194	59	15	0.1	204	14	0.14
7-2	65	26	374	0	1013	70	10	0.1	192	18	0.17
7-3	59	25	313	0	894	69	13	0.1	194	16	0.15
7-4	55	32	297	0	1595	71	15	0.1	246	23	0.14
7-5	54	32	351	0	831	72	13	0	210	17	0.13
平均	58.4	29.2	346.6	0	1105.4	68.2	13.2	0.08	209.2	17.6	0.15
SD	4.3	3.4	41.8	0.0	306.6	5.3	2.0	0.0	21.8	3.4	0.0
平均値 正常範囲 (文献値)	37-175	13-84	70-820	0-3	124-1590	33-166	20-199	0-0.5	70-230	10.3-20.0	0.15-0.9

Animal No.	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	CL (mmol/L)	CA (mg/dL)	P (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	A/G	ALB (%)	α 1-globin (%)	α 2-globin (%)	β -globin (%)	γ -globin (%)
7-1	132	10.1	103	10.3	9.7	5	3.2	1.1	51.5	18.1	10.7	15.7	4
7-2	134	9.3	104	10.4	10.1	4.8	3.1	1.3	56.8	15.6	9.7	15.5	2.4
7-3	137	6.2	103	10.1	9.4	4.8	3	1.1	52.6	18	10.6	16.8	2
7-4	137	6.3	104	10.3	8.9	5.2	3.2	1.1	52.7	18.6	9.2	16.2	3.3
7-5	139	4.9	104	10.2	8.8	5.2	3.3	1.3	56.7	17.8	8.9	14.8	1.8
平均	135.8	7.36	103.6	10.26	9.38	5	3.16	1.18	54.06	17.62	9.82	15.8	2.7
SD	2.8	2.2	0.5	0.1	0.5	0.2	0.1	0.1	2.5	1.2	0.8	0.8	0.9
平均値 正常範囲 (文献値)	114-146	3.0-7.6	92-116	4.7-11.7	0.6-10.6	4.8-7.0	2.0-4.5	0.49-3.37	42.6-62.3	13.6-26.7	4.4-9.7	10.2-19.5	1.1-7.3

血液生化学検査結果: 14日間埋植

Animal No.	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	CPK (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	ALP (IU/L)	T-CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	T-BIL (mg/dL)	GLU (mg/dL)	BUN (mg/dL)	CRNN (mg/dL)
14-1	42	27	168	0	753	60	65	0	219	15	0.2
14-2	46	30	165	1	1031	49	48	0	206	18	0.18
14-3	45	31	173	0	969	50	36	0	245	16	0.18
14-4	45	27	179	1	892	57	19	0	207	17	0.22
14-5	44	23	162	0	867	54	18	0	219	16	0.21
平均	44.4	27.6	169.4	0.4	902.4	54	37.2	0	219.2	16.4	0.198
SD	1.5	3.1	6.7	0.5	105.7	4.6	19.9	0.0	15.7	1.1	0.0
平均值 正常範囲 (文献値)	37-175	13-84	70-820	0-3	124-1590	33-166	20-199	0-0.5	70-230	10.3-20.0	0.15-0.9

Animal No.	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	CL (mmol/L)	CA (mg/dL)	P (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	A/G	ALB (%)	α 1-globlin (%)	α 2-globlin (%)	β -globlin (%)	γ -globlin (%)
14-1	135	7.6	100	10.2	6.9	5.4	3.4	1.2	54.2	18.1	9.4	15.9	2.4
14-2	136	6.8	99	9.9	7.5	5.1	3.1	1.1	52.6	18.6	10.6	15.8	2.4
14-3	137	6.4	99	9.9	7.7	5.3	3.3	1.1	52.8	19.5	8.3	16.6	2.8
14-4	137	6.2	100	10.3	7.5	5.5	3.3	1.1	52.2	19	9.5	16.9	2.4
14-5	139	5.1	99	10.2	7.4	5.7	3.5	1	51.1	17.1	10.2	17.3	4.3
平均	136.8	6.42	99.4	10.1	7.4	5.4	3.32	1.1	52.58	18.46	9.6	16.5	2.86
SD	1.5	0.9	0.5	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	1.1	0.9	0.9	0.6	0.8
平均值 正常範囲 (文献値)	114-146	3.0-7.6	92-116	4.7-11.7	0.6-10.6	4.8-7.0	2.0-4.5	0.49-3.37	42.6-62.3	13.6-26.7	4.4-9.7	10.2-19.5	1.1-7.3

血液生化学検査結果:28日間埋植

Animal No.	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	CPK (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	ALP (IU/L)	T-CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	T-BIL (mg/dL)	GLU (mg/dL)	BUN (mg/dL)	CRNN (mg/dL)
28-1	46	28	169	0	596	54	63	0	236	20	0.15
28-2	40	34	138	0	700	59	112	0	248	23	0.2
28-3	37	27	105	1	518	62	64	0	244	17	0.18
28-4	42	24	154	1	684	68	60	0	239	16	0.17
28-5	39	22	130	0	521	63	74	0	281	19	0.2
平均	40.8	27	139.2	0.4	603.8	61.2	74.6	0	249.6	19	0.18
SD	3.4	4.6	24.3	0.5	86.6	5.2	21.6	0.0	18.1	2.7	0.0
平均値 正常範囲 (文献値)	37-175	13-84	70-820	0-3	124-1590	33-166	20-199	0-0.5	70-230	10.3-20.0	0.15-0.9

Animal No.	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	CL (mmol/L)	CA (mg/dL)	P (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	A/G	ALB (%)	α 1-globlin (%)	α 2-globlin (%)	β -globlin (%)	γ -globlin (%)
28-1	139	3.9	99	10.6	6.7	6	3.6	1.2	54.1	20.4	8.3	16.2	1
28-2	140	3.7	101	10.3	6	5.7	3.4	1.1	52.4	22.4	8	15.7	1.5
28-3	141	3.5	99	10.4	6.3	5.8	3.5	1.2	55	22	6.3	15.6	1.1
28-4	138	4.7	100	10.1	6.4	5.8	3.5	1.2	55.4	21.4	5.7	16.6	0.9
28-5	139	3.8	100	10.2	6.6	5.8	3.5	1.2	55.2	19.3	7.5	16.8	1.2
平均	139.4	3.92	99.8	10.32	6.4	5.82	3.5	1.18	54.42	21.1	7.16	16.18	1.14
SD	1.1	0.5	0.8	0.2	0.3	0.1	0.1	0.0	1.2	1.3	1.1	0.5	0.2
平均値 正常範囲 (文献値)	114-146	3.0-7.6	92-116	4.7-11.7	0.6-10.6	4.8-7.0	2.0-4.5	0.49-3.37	42.6-62.3	13.6-26.7	4.4-9.7	10.2-19.5	1.1-7.3

Table 2 Histopathological findings at implant sites

N-HT140216

Observation Parameter	Implantation substance Animal No.	Control ^{a)}					Test sample				
		071	072	073	074	075	071	072	073	074	075
Cell type / response ^{b)}											
1) Polymorphonuclear cells		0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
2) Lymphocytes		1	1	1	1	1	2	3	2	3	3
3) Plasma cells		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4) Macrophages		0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
5) Giant cells		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6) Necrosis		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Sub-total		2	2	3	2	3	6	8	6	7	8
	Average			2.4					7		
Other findings (response) ^{b)}											
7) Neovascularization		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
8) Fibrosis		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
9) Fatty infiltrate		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total		0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
	Average			0					2		
Total		2	2	3	2	3	8	10	8	9	10
	Average			2.4					9		

a): Subcutaneous tissue in the section

b): See the tables of scoring criteria (ISO 10993-6:2007 (E))

Cell type/response

Cell type/response	Score				
	0	1	2	3	4
Polymorphonuclear cells	0	Rare, 1-5/phf ^{c)}	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Lymphocytes	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Plasma cells	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Macrophages	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Giant cells	0	Rare, 1-2/phf	3-5/phf	Heavy infiltrate	Sheets
Necrosis	0	Minimal	Mild	Moderate	Severe

^{c)}: phf = per high powered (x400) field

Response

Response	Score				
	0	1	2	3	4
Neovascularization	0	Minimal capillary proliferation, focal, 1-3 buds	Groups of 4-7 capillaries with supporting fibroblastic structures	Broad band of capillaries with supporting structures	Extensive band of capillaries with supporting fibroblastic structures
Fibrosis	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band
Fatty infiltrate	0	Minimal amount of fat associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulation of fat cells about the implant site	Extensive fat completely surrounding the implant

Table 2 Histopathological findings at implant sites

N-HT140217

Observation Parameter	Implantation substance	Control ^{a)}					Test sample				
	Animal No.	141	142	143	144	145	141	142	143	144	145
Cell type / response ^{b)}											
1) Polymorphonuclear cells		0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2) Lymphocytes		1	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3) Plasma cells		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4) Macrophages		0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
5) Giant cells		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6) Necrosis		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total		2	3	3	3	3	6	6	6	6	6
	Average			2.8					6		
Other findings (response) ^{b)}											
7) Neovascularization		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
8) Fibrosis		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
9) Fatty infiltrate		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total		0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
	Average			0					2		
Total		2	3	3	3	3	8	8	8	8	8
	Average			2.8					8		

^{a)}: Subcutaneous tissue in the section

^{b)}: See the tables of scoring criteria (ISO 10993-6:2007 (E))

Cell type/response

Cell type/response	Score				
	0	1	2	3	4
Polymorphonuclear cells	0	Rare, 1-5/phf ^{c)}	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Lymphocytes	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Plasma cells	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Macrophages	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Giant cells	0	Rare, 1-2/phf	3-5/phf	Heavy infiltrate	Sheets
Necrosis	0	Minimal	Mild	Moderate	Severe

^{c)}: phf = per high powered (x400) field

Response

Response	Score				
	0	1	2	3	4
Neovascularization	0	Minimal capillary proliferation, focal, 1-3 buds	Groups of 4-7 capillaries with supporting fibroblastic structures	Broad band of capillaries with supporting structures	Extensive band of capillaries with supporting fibroblastic structures
Fibrosis	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band
Fatty infiltrate	0	Minimal amount of fat associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulation of fat cells about the implant site	Extensive fat completely surrounding the implant

病理検査：14日間