医用高分子の生物学的試験

高分子材料の医療用あるいは歯科用としての適否の判断はなかなか困難で、多くの場合、まず強度、硬度、耐摩耗性や低分子化合物、添加物質の溶解などの理化学的試験を行なって選択したのち、マウス、ウサギなどの動物を使用して生物学的試験を行ない、その毒性、刺激性などの問題がないと判明したのち初めて臨床に使用されるものである。いわば、生体への適合性もしくは安全性を調べるのが生物学的試験の目的であり、その方法について概説した。

堀 部 隆*・桑 村 司**

1. はじめに

今日高分子化学の発達により数多のポリマーが合成されているが、医学用および歯科用として使用されているものは数種にすぎない。それは他の工業用材料と異なり、医用として第1表のごとき条件をみたすことが必要で、そのレベルに応じて使用範囲は限定されてくる。体内で長期間使用される人工心臓弁、人工血管、ペースメーカー、人工骨頭などの人工臓器にはフッ素樹脂、ポリエステル、ポリアセタール、ポリエチレン、シリコーンを、暫時に使用される人工心肺、人工腎臓、テンポラリーペースメーカー用電極あるいは輸血、輸液セット、注射筒、注射針などのディスポーザブル医療用具には塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリアミドなどが使用されている。

一般に人工臓器および医療用具の試験はそれぞれの医療用具の基準¹⁾によって行なわれ、その使用目的に応じて引張強さ、伸び、耐圧、耐摩耗、漏洩などの物理的試験や、pH、にがり、過マンガン酸カリウム還元性物質、重金属、蒸発残留物などの化学的溶出の限度

が規定されている²⁾。そしてこれらの基準中の物理、化学的試験に適合する高分子材料について、さらに生

第1表 医用高分子の必要条件

1. 生体内において、長期間化学的に安定性
2. 組織内において、性能（機能）の劣化がない
3. 血液および周囲組織に対し、炎症および異物反応がない
4. 加熱あるいは薬液による滅菌で変質しない
5. 発熱性、急性および慢性毒性を示さない
6. 発癌性がない

第2表 医療用具の生物学的試験

試験項目 基準名	急性 毒性 性	皮 内 反 応	発 質 熱 性 物	溶 血 性	移 植	無 菌
ディスポーザブル						
注射針	○	○	○			○
注射筒	○	○	○			○
輸血セット	○		○			○
輸液セット	○		○			○
採血用器具	○		○			○
人工心肺	○		○	○		○
人工血管	○					
接着剤	○	○	○			
人工心臓弁	○	○	○	○	○	○
輸液用プラスチック容器	○	○	○	○	○	

* Takashi HORIBE 国立衛生試験所療品部 (158 東京都世田ヶ谷区上用賀 1-18-1) 歯博

** Tsukasa KUWAMURA 同上 薬理部
Biological Test of Polymers for Medical Use

物学的にその影響が検討されたのち、医用高分子として使用されている。

2. 生物学的試験の必要性

高分子材料が物理、化学的試験で良好な成績を示してただちにヒトに使用することには問題が多いので、まず生体の周囲組織、細胞に対するなじみやすさ、生物学的 degradation、ポリマー自体ないしその分解物質あるいは添加されている安定剤、可塑剤、抗酸化剤の溶出による影響について総合的な試験をするため、種々の生物学的試験を行なう必要がある。

3. 生物学的試験

3-1. 生物学的試験のための試験液調製法

高分子材料を生体に適用する際、有害な物質が溶出してはならないことはいうまでもない。これをチェックするために、日局輸液^{a)}用プラスチック容器の生物学的試験^{b)}では次のようにして調製した試験液について試験を行なうよう規定している。試料の厚さの均一な部分を取り、厚みが 0.5 mm 以下のときは、表裏の表面積の合計が約 1,800 cm² になるように、また厚みが 0.5 mm を越えるときは約 900 cm² になるように切断し、さらにこれを長さ 5 cm、幅約 0.5 cm の大きさに細断し、中性洗剤の溶液、水および注射用蒸留水で順次洗い、汚染をさけて室温で乾燥する。これを内容約 500 ml のガラス容器に入れ、生理食塩液 300 ml を加え、融封または適当なせんで密封した後、高

堀部 隆氏(左) 昭和23年東京都立化学工業専門学校卒業、昭和30年東京理科大学理学部物理学科卒業。研究は医用材料歯科材料の理化学的試験および試験法など。現在の研究は人工臓器材料の試作および溶出に関する研究。著作に「医療用機器基準解説」。趣味は音楽（オペラを観ること）。

桑村 司氏(右) 昭和28年日本大学農獣医学部獣医学科卒業。同年国立衛生試験所薬理部勤務。専門分野は薬理学。現在の研究は化学物質の催奇形性に関する研究および薬物の内分泌に及ぼす影響に関する研究。趣味は囲碁（岡目八目的）、無芸徒食の部類に属する。

a) 輸液とはブドウ糖注射液、リンゲル液などの血液の代用として使用される注射液

圧蒸気滅菌器を用いて121°Cで1時間加熱し、室温になるまで放置し、これを試験液Aとする。別に同様な方法で空試験液A'を調製する。

また試料を試験液Aの調製法を準用して細断、洗浄、乾燥し、ガラス容器に入れる。これに5%エタノール生理食塩液 300 ml を加え、融封または適当なせんで密封した後、70°C で 24 時間加熱し、室温になるまで放置し、これを試験液Bとする。別に同様な方法で空試験液B'を調製する。以上の抽出条件は、生体では起こりえない、かなり厳しい条件であると受取られるかもしれないが、できる限り高い安全性を保障しようとする考えからである。

3-2. 急性毒性試験

体重 17~23 g の均一系または純系の雄マウス各群 10 匹を用い、試験動物の体重 1 kg につき、A、A' および B、B' の液をそれぞれ 50 ml 静脈内に注射し、注射後 5 日間観察するとき各群に死亡例を認めてはならない。なお、外国³⁾⁻⁶⁾では観察期間を静脈注射直後、4、24、48、ならびに 72 時間以後に観察し、空試験群と比較することが行なわれている。輸液用プラスチック容器用試料として、ポリカーボネート (PC)、ポリプロピレン (PP)、およびポリエチレン (PE) について試験を行ない、生理食塩液、5%エタノール生理食塩液いずれも死亡例はなく、B、B' 液では注射後一時的に酸酔状態が観察された以外、他に特に中毒症状は認められなかった⁷⁾。

3-3. 皮内反応試験

体重 2.5 kg 以上の雄ウサギ各群 2 匹を用い、その 1 群には各試験動物につき脊柱の片側に試験液Aを 0.2 ml ずつ 10 カ所、他の側に空試験液A'を 0.2 ml ずつ 5 カ所皮内注射する。他の 1 群には試験液Bおよび空試験液B'を用い、同様に操作する。注射後 24、48 および 72 時間後に観察するとき、局所に紅斑、浮腫、出血および壊死などを認めてはならない。米国薬局方⁸⁾ および NF⁴⁾ ではポリエチレングリコールと油抽出液も試験液に加えている。各試料の皮内反応試験は紅斑、浮腫、出血、壊死などの局所反応は全例に認められなかった。

3-4. 発熱性物質試験

A' 液を対照としA液について試験を行なう。体重 1.5~2.7 kg のウサギ 3 匹を用い、体重 1 kg につき試験液 10 ml を注射し、注射後 1 時間間隔で 3 回体温を測定し、体温上昇 0.6°C 以上の試験動物が 2 匹または 3 匹のときは発熱物質陽性と判定する。また体温上昇 0.6°C 以上のものが 1 匹であるとき、または 3 匹の体温上昇の合計が 1.4°C を越えるときは、さらに試験を行なう。生理食塩液で抽出した各試料液につい

て検討したところ、空試料、PC、PP、PE の各試料液とも発熱性物質陽性と判定されるような体温上昇例は認められず、すべてが発熱性陰性であった⁷⁾。

3-5. 溶血試験

試験液A 10 ml にウサギ脱繊維血 0.1 ml を加え、37°C で 24 時間放置するとき、溶血を認めてはならない。また別に対照として A' 液 10 ml をとり同様に操作する。生理食塩液で抽出した各試料液について検討したところ、PP、PC、PE より試料液は空試料液と同様溶血は認められなかった⁷⁾。なお脱繊維血を調製する際、必要以上振とうを与えぬよう注意することを田中⁹⁾は指摘している。

3-6. 凝血試験

血液の凝固に関する試験として古くより Lee white 法があるが、最近では高分子試験に接触する血液の動的状态における凝血が研究されている。井街ら⁹⁾は犬の静脈血をパイプで導き高分子試料を接触させ、Gott ら¹⁰⁾は犬の静脈中に高分子製リングを入れて血液と接触させ、新井¹¹⁾は犬の心臓(心房)内に高分子フィルムを挿入し、解剖により凝血を観察している。また中浦ら¹²⁾はウサギ動脈中に高分子試料を入れ、経時的に採血しスロンプラスチックフィルムにより凝血状態を自記記録するなどの研究も行なわれている。

3-7. 移植試験

長さ約 10mm、幅約 1mm の高分子材料の切片 8 枚を調製し、中性洗剤の溶液、水および注射剤用蒸留水で順次洗った後、滅菌して試料とする。別に移植試験用対照プラスチックは米国薬局方³⁾では U.S.P Negative Control Plastic Reference Standard (ポリエチレン) をとり、同様の方法で対照試料 4 枚を調製す

る。

体重 2.5 kg 以上の雄ウサギ 2 匹を用い、滅菌した 15 ゲージの注射針(スタイレット)内にあらかじめ試料を別々に挿入し、試験動物の各 1 匹につき、片側の背柱旁筋肉内に背柱から約 3.5 cm 離して約 2.5 cm 間隔で 4 枚の試料をスタイレットを用いて移植する。背柱の他の側に対照試料を同様に 2 枚移植する。移植 72 時間後に試験動物を麻酔させ脱血した後、試料を囲む筋組織を肉眼または拡大鏡を用いて検査するとき、出血、被包形成などを認めないか、または認めても 1 匹につき 4 カ所のうち 1 カ所以内でなければならない。

本試験法は人工血管や組織接着剤などのように、その適用後生体内に長時間残存する材質については必須の試験項目で、また輸液用プラスチック容器についても行なわれている。各試料および U.S.P Negative Control を移植し、PP および PE を移植したウサギは大量のペントバルビタールで麻酔させ、PC 移植ウサギは麻酔したのち、放血致死させ、試料を囲む筋組織を観察した。第 3 表に示したように、PP は 2 匹中 1 匹に 1 カ所出血を認め、PE は初回では 1 匹に 1 カ所、2 匹に 3 カ所の出血を認めたが、2 回目の実験では 2 匹中 1 匹に 1 カ所の被色形成と出血を認めただけで、他の 1 匹には異常所見は認められなかった。PC は初回では 2 匹とも異常なく、2 回目の実験で 2 匹中 1 匹に 1 カ所の出血を認めたのみであった。

さらに、マウスを用い、テフロン、シリコーン、塩化ビニルを側腹部皮下に移植し、前と同様に被包反応状態を観察した。

3-8. 組織培養試験

多数の試料について上述の移植試験、皮内反応試験

第 1 図 家兎背筋内移植

第 3 表 移植試験

(移植後の筋組織の出血、被色形成)

試料	実験回数	動物番号	移植部位(試料)				移植部位(対照)		判定
			1	2	3	4	1	2	
ポリプロピレン	1 回	1	—	+	—	—	—	—	—
		2	—	—	—	—	—	—	—
	2 回	3	+	—	—	—	—	—	—
		4	—	—	—	—	—	—	—
ポリエチレン	1 回	5	+	—	—	—	—	—	—
		6	+	+	—	—	—	—	+
	2 回	7	—	+	—	—	—	—	—
		8	—	—	—	—	—	—	—
ポリカーボネート	1 回	9	—	—	—	—	—	—	—
		10	—	—	—	—	—	—	—
	2 回	11	+	—	—	—	—	—	—
		12	—	—	—	—	—	—	—

—: 出血、被色形成なし, +: 出血, ++: 出血と被色形成, 移植部位 1→4: 頭側から尾側に向かって

第2図 テフロン[®]の移植試験（1ヵ月）
材質との接触面に薄い線維性被膜が形成
され、軽度の円形細胞浸潤が見られる

第3図 シリコンラバーの移植試験（1ヵ月）
材質との接触面に厚い線維性被膜が形成
され、軽度の円形細胞浸潤が見られる

第4図 塩化ビニルの移植試験（1ヵ月）
炎症性反応が強く、材質との接触面に強
度の細胞浸潤があり、その周囲に線維増
殖し、多数の血管新生が認められる

などを行なうには、かなりの時間と経費を必要とする
ので、Guessら¹³⁾はスクリーニング・テストとして、
鶏胚または L 細胞（マウス皮下結合組織からの線維芽
細胞）を用い、いわゆる組織細胞培養法を応用して、
多数のプラスチックについて検討を加えている。

in vitro の実験は、時間、労力、経費の節約がえら
れるばかりでなく、比較的簡単な設備で実施できる利
点を持ち、スクリーニング テストとして有用な手段
であるが、*in vivo* における実験結果とは必ずしも平
行しないことを念頭に置くことが必要である。なお、
培養法の手技については、文献^{14)~16)}を参照されたい。

3-9. 歯科用高分子材料の生物学的試験

義歯床用レジン材料および前歯充テン用レジン材料
(Direct Self-Curing Resin) の試験方法については、
わが国において JIS 規格¹⁷⁾の中で、強度、硬度、吸
水および溶解量などの理化学的試験が定められている
が、生物学的試験については検討中で決定されていな
い。米国ではこれらの生物学的試験として、Mitchel
ら¹⁸⁾の行なったラットの皮下組織移植試験や組織培養
ならびに米国薬局方急性毒性などの生物学的試験¹⁹⁾を
行ない、その成績を評価したのち (Level I)、動物
(サル) の歯牙硬組織¹⁹⁾に (Level II)、次いでヒト
(Level III)²⁰⁾ について実験を行ない、その毒性を評
価し安全性を確かめている。

4. おわりに

高分子材料を人工臓器や医療器具に使用する際の適
否の判定はかなり困難で、物理化学的試験で良好な結
果を収めても、必ずしも臨床上で複雑な生体のメカニ
ズムの中では必ずしも満足な成績を収めるとは限ら
ず、またその逆の場合もまれにはある。

臨床に使用する以前のスクリーニング テストとし
て各種動物を使用する生物学的試験は、安全性をチ
ェックするうえに重要な役割を果すものと思われ、わ
が国で実施されている基準中の生物学的試験について
簡単に記したが、医薬品、農薬などの開発時に課せら
れているような慢性毒性試験、発癌性試験、催奇形性
試験、次世代に及ぼす影響に関する試験などは今後に
残された課題となろう。

文 献

- 1) 療品研究会編：医療機器基準解説，薬業事報社
(1972)
- 2) 第8改正 日本薬局方第1部，p. 832, 853 (1971)
- 3) U.S. Pharmacopoeia XVIII, 886, 926 (1970)
- 4) N.F. XIII, 840 (1970)
- 5) 仏局 VIII, 追補 No. 25 (1963)

- 6) スイス薬局方 V, 追補 II, 5 (1961)
- 7) 昭和 44 年度厚生科学研究報告, 医薬品用樹脂容器の滅菌法に関する研究, 東京医薬品工業協会, p. 100, 408 (1970)
- 8) 田中 悟ら: 衛生試報, **89**, 148 (1971)
- 9) 井街 宏ら: 第 8 回日本人工臓器学会抄録(1970)
- 10) V. Gott, *et al.*; *Bull. N.Y. Acad. Med.*, **48**, 482 (1972)
- 11) 新井達太: 未発表
- 12) 中浦慎介ら: 衛生試報, **90**, 49 (1972)
- 13) W.L. Guess, *et al.*; *J., pharm., Sci.*, **54**, 1545 (1965)
- 14) S.A. Rasenbluth, *et al.*; *J., Pharm., Sci.*, **54**, 156 (1965)
- 15) A.B. Jones, *et al.*; *J., Pharm., Sci.*, **57**, 293 (1968)
- 16) 中井進之助ら: 組織培養—基礎と応用—朝倉書店 (1964)
- 17) 日本工業規格 JIS T 6501 義歯床用アクリリク樹脂, T 6508 歯冠用加熱重合レジン, T 6509 歯科用充テン用即時硬化レジン
- 18) D.F. Michel; *J., A. d. A.*, **59**, 954 (1959)
- 19) K. Langeland; *Int. Dent. J.*, **17**, 405 (1967)
- 20) H.R. Stanley; *Oral Surg.*, **25**, 633 (1968)

●ご応募下さい。——本誌掲載広告カタログ送呈 (A 376 頁をご覧ください)