

ウサギにおける脳内埋植試験法の検討

今野和則¹, 磯江孝治¹, 熊谷文明¹, 太田秀春¹, 斉藤義明¹, 太田 亮²

Examination of the brain implantation test in rabbits

Kazunori KONNO¹, Koji ISOE¹, Fumiaki KUMAGAI¹, Hideharu OHTA¹, Yoshiaki SAITO¹, Ryo OHTA²

緒言

医療機器のリスクマネジメントプロセスの一環として生物学的な安全性を評価するにあたり、医療機器の生物学的安全性評価で考慮すべき評価項目のなかに埋植がある。埋植は医療機器の分類が表面接触医療機器、体内と体外とを連結する医療機器およびインプラント医療機器のなかで主に人体への接触期間(累積)が短・中期的(24時間を超え、30日以内)から長期的(30日を超える)なものに対して評価が求められ、その評価法として *in vivo* 試験による埋植試験がある。埋植試験は医療機器または原材料が、その適用部位の生体組織へ及ぼす局所的な影響を病理学的(肉眼的検査および組織学的検査)に評価する試験であり、国内のガイダンスである薬生機審発0106第1号¹⁾のほか、ISO 10993のPart 6²⁾にも詳しい試験法が掲載されている。動物への埋植は主に筋肉、骨、皮下および脳の4つの部位から臨床に適用される部位に近い組織(組織・器官の起原、構成組織、細胞種などを勘案)を選択し、ガイダンスで推奨されている各部位の試験法で評価するのが一般的である。そのなかでも2016年12月1日にISO 10993-6(Third edition)に追加された脳に対する局所的な影響を評価する脳内埋植試験法は、他の部位の埋植試験法よりも高度な埋植技術を要し、術後動物の一般状態(行動)に対しても大きく影響することが予想される。また、検査方法も体系的ではなく複雑である。そこで、ウサギを用いた脳内埋植による手術操作、術後の行動学および神経学的徴候、脳に対する病理学的な組織反応について検討した。

材料および方法

1. 埋植試料

脳組織に対する病理学的な陽性反応を確認するために、埋植試験の陽性対照材料として、一般的に使用されているジエチルジチオカルバミン酸亜鉛(Zinc diethyldithiocarbamate)を0.75%含有させたポリウレタンロッドを一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所より入手し、EOG滅菌処理して使用した。埋植試料のサイズは、幅1×1 mm、長さ2 mmのロッド状とした。

2. 動物

動物は、雄の日本白色種(Kbs: JW)ウサギを5匹使用した。温度21~25℃、湿度40~75%、換気設定約15回/時間、明暗サイクル12時間(点灯時間7~19時)に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージに個別に収容し、飼料(LRC 4, オリエンタル酵母)を制限給餌(約130 g/日)、水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

埋植期間は1週間と4週間の2期間を設定した。試験群は1週間埋植群および4週間埋植群の2群構成とし、1週間埋植群に2匹、4週間埋植群に3匹の動物を割り振った。

3. 埋植方法

すべての実験操作は、「一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」に基づき、承認(動物実験承認番号: 1170117A, 4170006A)を得て実施した。

埋植部位は大脳皮質内とした。埋植部位数は1匹の大脳右半球に2か所とし、1か所あたり1本の埋植試料を埋植した。埋植前の処置として、三種混合麻酔薬(塩酸メドミジン、ミダゾラムおよび酒石酸ブトルフェノールの混合液)を調製し、動物の臀部へ筋肉内注射(1.2 mL/kg)して、

1 安全性事業部 一般試験検査1G

2 安全性事業部

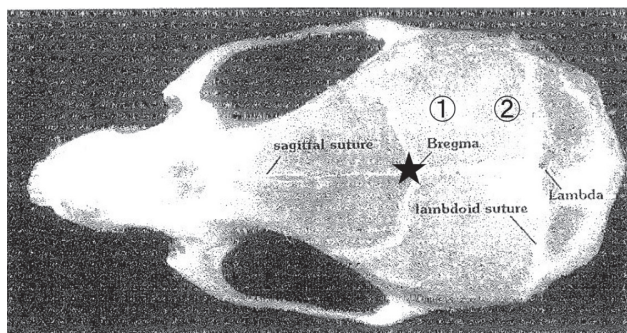


写真1 ウサギの頭蓋骨における埋植部位(切削部位)の位置

★：矢状縫合と冠状縫合との交点(Bregma)

①：Bregmaから右側の側頭葉側に向かって約5 mm, 後頭葉側に向かって約7 mmの位置

②：Bregmaから右側の側頭葉側に向かって約5 mm, 後頭葉側に向かって約14 mmの位置

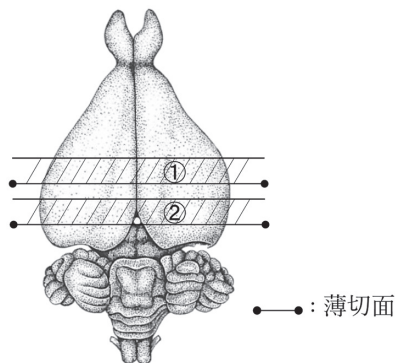


図1 切り出し部位および薄切面

埋植部位(①および②)を含む厚さ約4 mmに切り出した。

全身麻酔を施した。麻酔後、術部を含めた動物の頭部を剪毛し、以下の手順で埋植手術を行った。(1)手術台にウサギを腹臥位に保定し、剪毛した頭部をヨード系消毒剤およびアルコール綿で消毒した。(2)頭部の正中線に沿って皮膚を約4 cm切開した。切開した皮膚を鈍性剥離して頭蓋骨を露出させ、骨膜を剥離した。(3)Bregmaから右側の側頭葉側に向かって約5 mm, 後頭葉側に向かって約7 mm(1か所目)および約14 mm(2か所目)の位置にフェルトペンでマーキングした(写真1)。(4)ハンドドリルを用いて、生理食塩液で洗いながらマーキング部分に直径約3 mmの穴をあけた。(5)穿孔した穴から目視にて硬膜を確認し、ピンセットを用いて硬膜を除去した。(6)埋植試料を挿入しやすいように22ゲージの注射針を用いて、大脳皮質を約5 mmの深さで穿刺した。(7)ピンセットで埋植試料を穿刺した穴に挿入し、埋

表1 一般機能検査(反射)

反射	方法
プライエル反応	突発的な音刺激に対する耳介反射の有無を観察する。
瞳孔反射	観察者の掌等で動物の頭部を覆い、約30秒間暗順応させた後、光にさらして縮瞳反応の有無を観察する。
痛覚反射	ピンセットで指趾間の皮膚を挟んだ時の嫌悪反応の有無を観察する。
後肢引き込み反射	後肢を伸展させ、反射的に直ちに引き込み、正常位に復する反応の有無を観察する。
眼瞼反射	眼瞼に触れたときに瞬目反射の有無を観察する。
正向反射	動物を背臥位に置き、直ちに立ち直る反射の有無を観察する。

植試料が完全に大脳皮質内に埋没することを確認した。(8)切開した頭蓋骨を高密度ポリエチレンシートで作製した円盤状の蓋で塞いだ。(9)切開した皮膚は縫合糸、手術用ワイヤーで縫合した。(10)術部をヨード系消毒剤およびアルコール綿で消毒した。(11)動物を飼育ケージに戻し、麻酔の覚醒を確認した。手術翌日に鎮痛剤として塩酸ブプレノルフィンを0.1 mL/匹の用量で動物の皮下へ6時間間隔で2回投与した。術後は毎日、常同行動および異常行動を含む一般状態について注意深く観察し、週に1回の頻度で体重を測定した。

4. 一般機能検査

術後、週に1回の頻度で中枢神経系の障害を確認するために動物を検査台の上におき、プライエル反応、瞳孔反射、痛覚反射、後肢引き込み反射、眼瞼(瞬目)反射、正向反射をみる一般機能検査(表1)を実施した。

5. 病理学的検査

埋植後1週間(埋植第8日)および4週間(埋植第29日)にそれぞれの動物をバルビツール酸系麻酔下で放血による安楽死処理を行い、脳を試料とともに摘出した。摘出した脳は4%パラホルムアルデヒド固定液で2日間浸漬固定し、その後リン酸緩衝液で洗浄した。

5.1 肉眼的検査

試料の縦断面が出るように埋植部位を切り出し(図1)、試料周囲組織および試料を実体顕微鏡下で表2に示す項目を観点として肉眼的検査を実施した。

表2 埋植局所における肉眼的検査の観点 (ISO 10993-6)

観察部位	肉眼的検査の観点
試料周囲組織	出血, 被包形成, 変色の有無 所見が認められた時は, その程度, 広がり, 厚さなどの詳細
埋植試料	変色および変質の有無 所見が認められた時は, 色, ひび割れの有無, 硬さなどの詳細
埋植部位近傍のリンパ節 (頸部)	腫脹などの変化
その他に認められた異常所見のすべて	

表3 埋植局所における組織学的検査の観点 (ISO 10993-6)

観察部位	組織学的検査の観点
試料周囲組織	埋植試料周囲のニューロンプロセスの破壊 埋植試料周囲のアストロサイトおよび結合組織の領域 大血管数の増加 リンパ球浸潤 マイクログリアの活性化 (特性評価) 被膜形成, 巨細胞およびマクロファージの存在 鉱質化および石灰化の領域 上衣層における変化およびくも膜顆粒における上記の変化
埋植痕に隣接する部位 (~3 mm, 同側)	炎症細胞 / 浸潤物 出血 壊死 グリオシス, 灰白質 グリオシス, 白色 その他

5.2 組織学的検査

切り出し後の試料を含めた埋植部位について, 組織染色標本 (HE 染色, Nissl 染色, LFB-HE 染色) および免疫組織化学染色標本 (アストロサイトマーカーの GFAP 染色およびマイクログリアマーカーの Iba1 染色) を作製し, 光学顕微鏡下で表3に示す項目を観点として組織学的検査を実施した。また, ISO 10993-6, Annex E で推奨されている神経組織の半定量スコアリングシステムの評価方法 (表4) を参考に, 試料周囲組織に認められた細胞の種類および組織反応を検索した。

結果

1. 一般状態および体重推移

埋植期間中の一般状態の観察では, いずれの動物においても, 外観, 姿勢, 体位, 歩行, 発声, 痙攣などの一般状態に異常は認められなかった。

また, 常同行動 (過度のグルーミング, 旋回行動) や異常行動 (自傷行動, 後ろ向き歩行) などの行動に対する異常も認められなかった。週に1回の頻度で体重測定を実施した結果, いずれの動物においても体重は順調に増加していた。

2. 一般機能検査

プライエル反応, 瞳孔反射, 痛覚反射, 後肢引き込み反射, 眼瞼 (瞬目) 反射, 正向反射を確認した結果, いずれの動物においても, 中枢神経系の異常を示す反射異常は認められなかった。

3. 病理学的検査

埋植後1および4週間の剖検では, 頭蓋骨切削部位を塞いだ高密度ポリエチレンシート製の蓋は頭蓋骨に留まっていたが, 一部浮いているか所もあった。摘出した脳組織は穿刺部に暗赤色の変色 (出血痕) が認められた (写真2)。

埋植後1および4週間の肉眼的検査では, 試料周囲組織に黒色 (写真3-A, 3-B) または乳白色の

表4 半定量スコアリングシステム - 神経組織の反応 - (ISO 10993-6, Annex E)

細胞の種類/反応	評価点				
	0	1	2	3	4
多形核白血球	0	まれ, 1~5/phf*	5~10/phf	中等度浸潤	集簇/凝集
リンパ球	0				
形質細胞	0				
マクロファージ	0				
多核巨細胞	0	まれ, 1~2/phf	3~5/phf		
変性/壊死	0	わずか	軽度	中等度	重度
血管新生	0	1~3の未熟血管が限局性にみられるわずかな毛細血管の増殖	線維芽細胞様構造で支持された4~7の毛細血管が集簇する	線維芽細胞様構造で支持された毛細血管が広域にみられる	線維芽細胞様構造で支持された毛細血管が広範囲に及ぶ
線維化	0	狭い領域	中等度の厚さの領域	厚い領域	広い領域
星状膠細胞	0	狭い領域	中等度の厚さの領域	厚い領域	広い領域
脂肪浸潤	0	狭い領域	中等度の厚さの領域	厚い領域	広い領域
その他の所見	: 変化なし, ±: 軽微, +: 軽度, 2+: 中等度, 3+: 重度, P: 順位尺度のない変化, NE: 検査なし, M: 消失, A: 自己融解				

*: phf = 強拡大(400倍)で1視野あたり

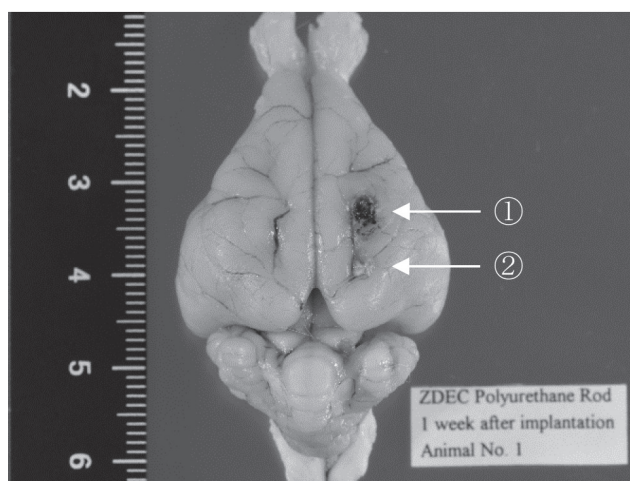


写真2 剖検時のウサギの脳

埋植部位①および②に穿刺痕がみられ、埋植試料の刺入部位①は暗赤色に変色している。

変色(写真3-C, 3-D)が認められた。また、いずれの動物においても試料自体は脳組織内に存在し、試料の脱落や突出は認められなかった。なお、埋植試料自体に変色・変質等の異常はなく、埋植部位近傍のリンパ節に腫脹等の異常所見は認められなかった。

組織学的検査では、埋植後1週間(埋植第8日)および4週間(埋植第29日)の試料周囲組織に好中球、リンパ球およびマクロファージの浸潤がみられ(写真4-B)、試料の界面に線維化による被膜形成(写真4-D)および神経膠細胞の消失が認められた。また、脳実質には出血および変性/壊死

(写真4-B)がみられ、泡沫状の空胞化(写真4-E)、フィブリン様物質の析出、鉍質沈着および血管新生(写真4-D)も認められた。免疫組織化学染色にてミクログリアおよびアストロサイトの分布を確認した結果、いずれも組織傷害部の外側で増殖活性化を示す傾向があった(写真5-A, 5-B)。

考察

今回、ウサギの右脳半球に2か所の埋植部位を設け、病理学的検査における炎症反応および壊死性の変化を確認するために陽性対照材料を大脳皮質内に1および4週間埋植したが、埋植期間中、いずれの動物においても死亡例はみられず、術創部に出血および化膿など外科的手術による影響は認められなかった。また、術後の動物に行動学的な異常など神経学的な兆候を示す所見も認められなかったことから、手術操作および埋植部位の位置に問題はないと考えられる。ただし、本検討の一般機能検査は主に反射について検査を行ったが、ISO 10993-6でも推奨されている Functional observation battery (FOB), Modified Irwin testなどを参考に検査することにより、より詳細に中枢神経系の障害を評価することが可能と考えられる。埋植部位についてはISO 10993-6において、脳実質表面の埋植について記載されていることから、次の検討課題としたい。

病理学的検査においては、剖検時に切削部位の

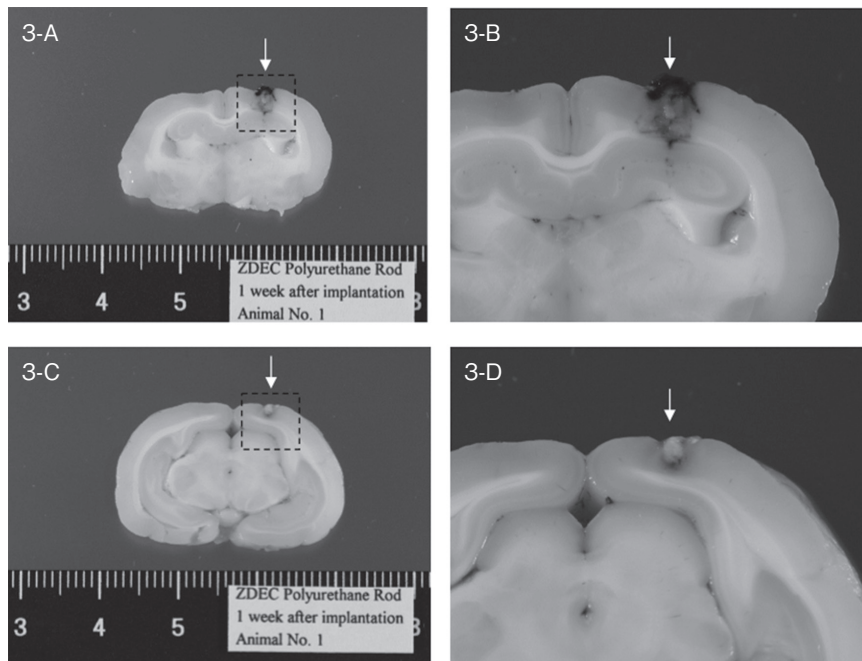


写真3 切り出し後のウサギ脳組織(埋植後1週間)

- 3-A : 埋植部位①の写真, 埋植部位を示す(矢印)
- 3-B : 3-Aの拡大像(点線の枠内), 埋植部位(矢印)に黒色の変色が認められる.
- 3-C : 埋植部位②の写真, 埋植部位を示す(矢印)
- 3-D : 3-Cの拡大像(点線の枠内), 埋植部位(矢印)に乳白色の変色が認められる.

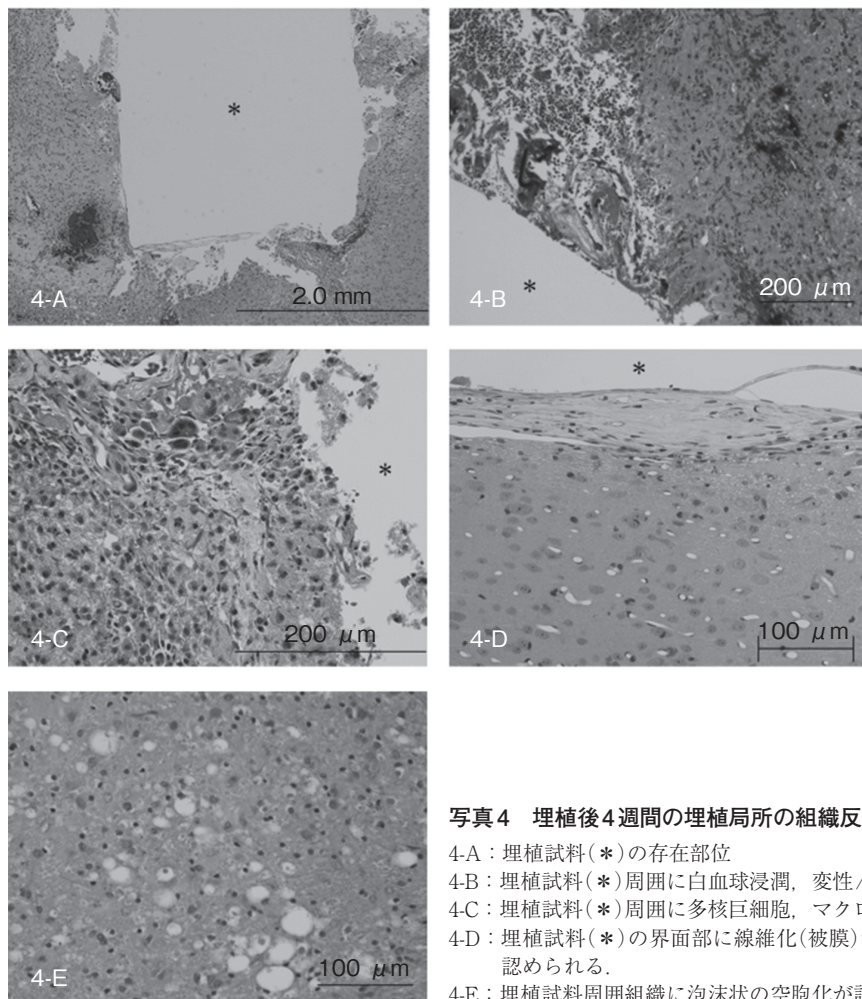


写真4 埋植後4週間の埋植局所の組織反応(HE染色)

- 4-A : 埋植試料(*)の存在部位
- 4-B : 埋植試料(*)周囲に白血球浸潤, 変性/壊死, 出血が認められる.
- 4-C : 埋植試料(*)周囲に多核巨細胞, マクロファージが認められる.
- 4-D : 埋植試料(*)の界面部に線維化(被膜)がみられ, 実質には血管新生が認められる.
- 4-E : 埋植試料周囲組織に泡沫状の空胞化が認められる.

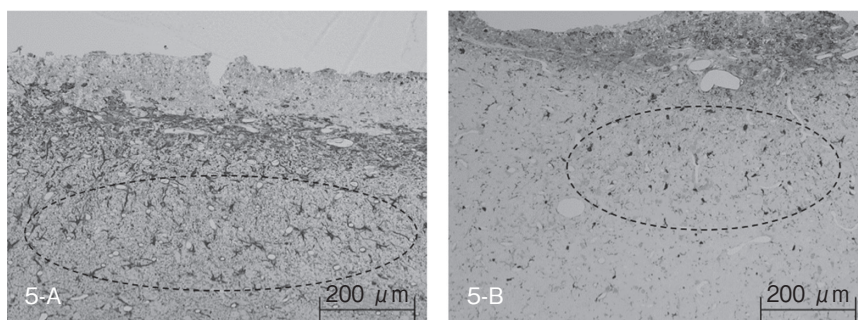


写真5 埋植後4週間の埋植局所の組織反応(免疫組織化学染色)

5-A : Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody, 点線の枠内に陽性反応を示す細胞(アストロサイト)が認められる。

5-B : Anti-iba-1 (Iba1) antibody, 点線の枠内に陽性反応を示す細胞(ミクログリア)が認められる。

蓋がわずかに浮いているか所があったことから蓋をする際は医療用接着剤で確実に固定したほうがよいと考えられた。ただし、医療用接着剤などの高分子化学物質を使用する場合、埋植試料との反応に注意して埋植試料および試料周囲組織に対して影響がないことを事前に確認する必要があると考える。肉眼的検査においては、試料周囲組織に出血痕と思われる黒色の変色が認められたが、試料自体は頭頂葉の脳皮質内に留まっており、留置する深さも問題なかった。組織学的検査においては、試料界面部に線維性被膜の形成およびフィブリン様物質の析出が観察されたが、HE染色標本による観察では形態的に鑑別することが困難な部位もあったことから、膠原線維を選択的に染めるマッソントリクローム染色法を用いることにより、より詳細な評価が可能となる。表4に示したISO 10993-6で推奨されている半定量スコアリングシステム(神経組織の反応)は、一般的に認められる炎症反応の例示であるが、その大部分の組織反応について確認ができ、さらに炎症反応以外

の壊死性の変化や既存細胞の分布についても確認ができた。なお、今回の検討では、摘出後の脳は固定液に浸漬させる浸漬固定法を用いたが、作製したいずれの組織標本においても評価が困難となるアーティファクトは認められなかった。ただし、免疫組織化学染色を実施する場合は、血管内に固定液を注入する灌流固定法を用いることが望ましいと考えられる。

今回の検討では手術操作および埋植する位置に問題ないことが明らかになり、短期間(1および4週間)の埋植による脳組織に対する組織反応について背景データが収集できた。

文献

- 1) 医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方についての改正について(令和2年1月6日, 薬生機審発0106第1号)
- 2) Biological Evaluation of Medical Devices - Part 6: Tests for Local Effects after Implantation (ISO 10993-6, December 1, 2016)