

19990737

厚生科学研究

医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価
に関する研究

(H10-医薬-041)

平成11年度 厚生科学研究：

医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価に関する研究

目次

総括研究報告書	1
分担研究報告書	
材料の長期埋植による異物発癌の評価に関する研究 土屋利江	46
硫酸化ポリウレタンの発癌性評価に関する研究 井上博之	63
天然医用材料の安全性評価に関する研究 配島由二	65

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

「医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価に関する研究」

主任研究官：土屋利江（国立医薬品食品衛生研究所療品部）

総括研究報告書

土屋 利江

国立医薬品食品衛生研究所

厚生科学研究費補助金（医薬安全研究事業）

総括研究報告書

医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価に関する研究

主任研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所療品部第三室長

研究要旨 医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価に関して、多面的な研究が必要である。緊急性の特に高いサブテーマを三つ取り上げ研究を行った。

（第一サブテーマ）ソフトセグメントの炭素数が異なるポリアルキルエーテルポリウレタンについて、V79 代謝協同阻害試験を実施した。その結果、ソフトセグメントが PEO1000、polypropylene glycol 1000、及び PHMO1000 からなるポリウレタンはいずれも細胞間連絡を阻害せず、これらのポリオール単独でも細胞間連絡を阻害しないことが明らかになった。しかし、PTMO1000 からなるポリウレタンは V79 代謝協同阻害活性を示し、PTMO1000 単独でも細胞間連絡を強力に阻害することが明らかになった。

ハードセグメント分率が 50 % のポリエーテルポリウレタンに、3 段階の置換率でプロパンスルホン酸を導入できた。

（第二サブテーマ）硫酸化ポリウレタンについて、ラットでの長期実験を行い、in vitro と in vivo との活性相関を明らかにする。

（第三サブテーマ）10 種類のコラーゲン製品から抽出液を調製し、リムルス試験、ヒト単球様細胞株での IL-6 産生誘導活性、ウサギ発熱活性、化学分析を行った結果、2 製品の抽出液中にエンドトキシン由来の生物活性が検出された。

分担研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部第三室 室長
井上 博之 (財) 食品農医薬品安全性評価センター
配島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 療品部第一室 室長

A. 研究目的

第 1 の目的は、ポリウレタンのソフトセグメント部分構造が 2 (PEO1000)、4 (PTMO1000)、6 (PHMO1000) と規則的に変化させたポリオールからなる材料を調製し、発癌性に関する in vitro 評価を行うことである。

(第一章)

第 2 の目的は、昨年度はハードセグメントの分率が 33 % の MDI/PTMO1000/BD 系ポリウレタンを用いて、硫酸化ポリウレタンの合成を行った。今年度は、強度が強い硫酸化ポリウレタンを合成するために、ハードセグメント分率 50 % の MDI/PTMO1000/BD 系ポリウレタンを用いて、硫酸化の置換率の異なるポリウレタンの合成法を検討することである。

(第一章)

第 3 の目的は、硫酸化ポリウレタンについて、ラットでの長期実験を行い、in vitro と in vivo との相関性を明らかにする。(第二章)

第4の目的は、近年急速に進展してきた組織工学を利用した医療技術の発展に寄与することを目的とし、各種天然医用材料の生体影響、特に、発熱を惹起する要因とそのメカニズムの解明を試みることである。平成11年度は、コラーゲン製医療用具により惹起される発熱と代表的な発熱性物質であるエンドトキシンとの相関性について、化学的・生物学的方法により検討することである。(第三章)

B. 研究方法

第1の方法は、ハードセグメントの分率が45%のP2(MDI/PEO1000/BD)、P4(MDI/PTMO1000/BDD)およびP6(MDI/PHMO1000/BD)のポリウレタン、および、それぞれを構成するソフトセグメントポリオール、合成に使用した触媒について、V79代謝協同阻害試験を用いて、ギャップ結合細胞間連絡阻害活性について試験した。

第2の方法は、強度が強いポリウレタンを合成するために、ハードセグメント分率が50%のポリエーテル型ポリウレタンを用いて、ウレタン結合のプロトンにプロパンスルホン基を置換する方法で、置換率の異なる硫酸化ポリウレタンを合成する方法を用いた。

第3の方法は、ウィスター雄ラットに、ポリウレタンフィルム、10%硫酸化ポリウレタンフィルム、20%硫酸化ポリウレタンフィルムの3種類の材料をラット背部皮下に埋植し、2年間の飼育観察を行い、発癌活性を確認する。

第4の方法は、創傷被覆等を目的とした医療用コラーゲン製品について、ウサギによる発熱性試験、化学分析(脂肪酸分析、2-ケト-3-デオキシオクトン酸分析)エンドトキシン、 β -グルカンおよびペプチドグルカンの定量、炎症性サイトカイン産生誘導活性を測定し、発熱と化学分析、生物活性との関係を明らかにした。また、エンドトキシンインヒビターおよび炎症性サイトカイン産生阻害剤を用いて、その抑制効果を確認した。

C. 研究結果

第1の結果は、P2およびP6はV79代謝協同阻害活性は陰性であった。P2およびP6を構成するソフトセグメントポリオールおよび合成に使用した触媒は、いずれもV79代謝協同阻害活性は陰性であった。P4は代謝協同阻害活性陽性で、その構成ポリオールであるPTMO1000も強い代謝協同阻害活性を示した。このように、炭素数が2,3,4,6のアルキルエーテルの繰り返し構造からなるポリオール(いずれも平均分子量が1000のもの)では、炭素数3のpolypropylene glycol 1000が擬陽性(1濃度でのみ有意に代謝協同阻害活性を示すもの)を示し、炭素数4のPTMO1000が明らかな陽性を示したものの、炭素数2のPEO1000や炭素数6のPTMO1000はV79代謝協同阻害作用を示さず、阻害作用と化学構造に一定の関係があることを明らかにすることができた。

第2の結果は、ハードセグメント分率50%のポリエーテル型ポリウレタンのウレタン結合部位のNに、6.2%、13.2%および24.4%の置換率でプロパンスルホン酸基を置換する事ができた。

第3の結果は、未修飾ポリウレタンおよび2段階の置換率で硫酸化したポリウレタンについて、ラットでの埋植試験を開始した。術後の経過は良好であり、いずれの群にも一般状態に異常を示す動物は認められていない。

第4の結果は、エンドトキシンに普遍的に存在する成分である2-ケト-3-デオキシオク

トン酸が、コラーゲン製品から抽出した試料中に存在する事を GC-MS で確認した。試験に使用したコラーゲン製品 10 製品の中で、2 製品の抽出液は、ウサギでの発熱性物質試験陽性であり、それぞれ製品 1 g 中に 242 EU と 2,200 EU のエンドトキシンに相当する発熱性物質が含まれている事が明らかになった。発熱陽性のコラーゲン製品抽出液では、炎症性サイトカインである IL-6 のヒト単球様細胞株 MM6-CA8 からの産生が誘導された。また、同抽出液をエンドトキシン吸着除去カラムで処理すると、サイトカイン産生誘導活性および発熱活性が消失する事も確認した。

D. 考察

第 1 の考察は、P2 および P6 は、細胞間連絡阻害活性は陰性であり、それを構成するソフトセグメント鎖 PEO1000 および PHMO1000 について試験した結果も陰性であった。P4 はソフトセグメントの構成ポリオールとして PTMO1000 を有するが、PTMO は、ポリアルキルエーテル型ポリオールの 4 種の中で唯一細胞間連絡阻害活性を明らかに示した化合物である。炭素数 2 (PEO1000), 3 (polypropylene 1000) および 6 (PHMO1000) では細胞間連絡を阻害せず、炭素数 4 の PTMO1000 のみの特異的に細胞間連絡を阻害する理由は明らかではない。しかし、細胞膜中にあるギャップ結合連絡を構成しているコネキシン蛋白との相互作用が PTMO1000 が有する物理化学的性質において最も阻害的に作用しやすい結果をもたらすためであろう。PEO1000 や polypropylene glycol 1000 では、極性が高く、負に荷電したエーテル性の酸素の荷電密度が高いため、細胞膜との相互作用が生じにくいために、ギャップ結合連絡機能が妨げられなかったものと考えられる。PHMO1000 では、ヘキサメチレン基ゆえに、PTMO1000 よりも脂溶性が高く、溶液状態で解けにくくなるために、ギャップ結合連絡機能に及ぼす影響を検出しにくい可能性がある。これらのポリウレタンの合成に使用された触媒には、細胞間連絡を阻害する活性が検出されなかった事より、溶出性の低分子からなる触媒には、細胞間連絡阻害活性がないものと考えられる。

第 2 の考察は、ハードセグメント分率 50 % のポリウレタンのウレタン結合の水素部位に、予測した置換率でプロパンスルホン酸を導入することができた。ポリウレタンはポリエーテル型であるが、ウレタン結合に隣接したメチレン基が最も酸化されやすいと考えられているが、陰イオン性の置換基をウレタン結合部位に導入することにより、そのような酸化分解も抑制されると考えられる。また、ポリウレタンの硫酸化率と血小板の粘着量とは、逆相関し、硫酸化率が高い程、抗血栓性も優れていることが報告されている。合成した硫酸化ポリウレタンでの低発癌性を動物実験で検証できれば、生体適合性に優れたポリウレタンの開発および市場化を促進すると考えられる。

第 3 の考察は、硫酸化の置換率の異なるポリウレタン 2 種と、未修飾ポリウレタンをラット皮下に埋植した。大きさは 1 x 2 cm で厚みは 1 mm のフィルム状のものを試験試料としている。動物も Wistar 雄ラットを用いており、過去に報告された材料発癌実験と同じ条件で行っている。現在までのところ、動物に異常は認められていない。発癌率等の結果ができれば、文献情報から他の材料での発癌率と比較することが可能となる。

第 4 の考察は、コラーゲン製品中に存在する発熱性物質がエンドトキシンである事を明確に示した。発熱陽性のコラーゲン製品の場合、ヒト単球様細胞に対する IL-6 産生誘導活性は、中和型インヒビターである CAP-18 では阻害効果に限界があるが、強力なインヒ

ビターである B-464 は、いずれの製品抽出液についても、IL-6 産生誘導活性を完全に阻害した。これらの成績から、抽出液中の IL-6 産生誘導物質はエンドトキシンであること、すなわち両コラーゲン製品中に存在する発熱性物質は混入しているエンドトキシンであることがほぼ確実になった。エンドトキシンが多く検出された製品は抽出により融解しており、融解により内在するエンドトキシンの抽出効率が上昇した可能性も考えられる。体内に埋入されてしまうタイプのコラーゲン製品については、製品内部のエンドトキシンも検出可能な抽出法を今後検討する必要があると考えられる。

E. 結論

ソフトセグメントの炭素数が異なるポリアルキルエーテルポリウレタンについて、V79 代謝協同阻害試験を実施した。その結果、ソフトセグメントが PEO1000 および PHMO1000 からなるポリウレタンは、細胞間連絡を阻害せず、これらのポリオール単独でも細胞間連絡を阻害しないことが明らかになった。しかし、PTMO1000 からなるポリウレタンは V79 代謝協同阻害活性を示し、PTMO1000 単独でも細胞間連絡を強力に阻害することが明らかになった。

ハードセグメント分率 50 % のポリエーテルウレタンに、3 段階の置換率でプロパンスルホン酸基をウレタン結合窒素に導入した。

天然由来医用材料の安全性を調査するために、コラーゲン製医療用具の使用により惹起される発熱の要因とメカニズムの解明をおこない、製品により惹起される発熱は、汚染したエンドトキシンに由来することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] 土屋利江 (1998) 高分子材料の *in vitro* 発癌プロモーション活性 高分子論文集 55, 314-322.
- [2] T.Tsuchiya and A.Nakamura (1999) Effect of material difference on inhibition of gap-junctional intercellular communication (GJIC) as an index of tumor promotion. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 74 Foreign bodies, surgical implants and prosthetic devices. pp.290-294.
- [3] 土屋利江、安全性評価 発癌性・変異原性・催奇形性：金属系バイオマテリアルの基礎と応用 (筏 義人、立石哲也、角田芳衛 編) アイピーシー、印刷中
- [4] T.Tsuchiya: A useful marker for evaluating the safety of tissue engineering products: Estimation of gap-junctional intercellular communication using V79 metabolic cooperation and cellular differentiation using rat embryonic mid brain cells. submitted.
- [5] R.Nakaoka, T.Tsuchiya, and A. Nakamura (2000) Studies on the mechanisms of tumorigenesis induced by polyetherurethane in rats: Production of superoxide, tumor necrosis factor, and interleukin 1 from macrophages cultured on different polyetherurethanes. J. Biomed.Mater. Res. 49, 99-105.
- [6] T.Tsuchiya, M.A.Sayed, and A.Nakamura (1999) Tumor promoting mechanisms of biomaterials: No involvement of mutation in cx43 gene in the tumorigenesis induced

by polyurethanes in vitro. *Animal Cell Technology* pp.181-185.

2. 学会発表

T.Tsuchiya, Md.Abu Sayed and A.Nakamura (1999) Role of connexins in tumors induced by biomaterials. International Symposium "Cell adhesion and communication in growth control and cancer". IARC, Lyon, France 19-21, January.

市川 明、土屋利江、中村晃忠：ポリウレタンの発癌性の分子機構 コネキシン遺伝子発現の解析 第21回日本バイオマテリアル学会大会 1999年11月 京都

配島由二、村井敏美、中川ゆかり、平田陸正、矢上 健、中村晃忠：天然医用材料の安全性評価に関する研究。第21回バイオマテリアル学会大会 1999年11月 京都

配島由二、村井敏美、中川ゆかり、平田陸正、矢上 健、中村晃忠：医療用ラテックス製品に含まれる発熱性物質の同定。日本薬学会第120年会 2000年3月 岐阜

第一章

材料の長期埋植による異物発癌 の評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 療品部

土屋利江

1. はじめに

異物発癌現象は、インプラント用具の長期的安全性評価において、未解決のままになっている最大の課題である。我々はすでに、その機構に関する新仮説を提出し、インビトロ評価試験法案を確立している。本研究においては、インビトロ評価法から低（または非）発癌性が予測された新しいポリウレタン等の動物実験を行うなどして、仮説と評価法の妥当性を検証する。

ポリウレタンはジイソシアナートとジオールの重付加反応から合成される。セグメント化ポリウレタンはポリオールとジイソシアナートからなるソフトセグメントブロック、および、ジイソシアナートとジオールからなるハードセグメントブロックの繰り返しから構成される。両ブロックは非相溶なマイクロ相分離構造を示すため、優れた抗血栓性と力学的特性を示すと考えられている。

また、ハードセグメントはウレタン基の水素結合により凝集し、その分率が 50%以下の場合力学的強度を高めていると考えられている。ソフトセグメントは通常、室温ではゴム状態であり、従って、ハードセグメントの分率あるいは、ポリオールの分子量により、コンプライアンスや弾性率を変化させ、必要とされる生体内力学特性と対応させる事ができる。

本年度は、ポリウレタンのソフトセグメント部分の構造が炭素数 2 (PEO1000)、4 (PTMO1000)、6 (PHMO1000) と規則的に変化させたポリオールからなる材料を調製し、発癌性に関する *in vitro* 評価を行なうことを第 1 の研究目的とする。

第 2 の研究目的は、昨年度はハードセグメントの分率が 33% の MDI/PTMO1000/BD 系ポリウレタンにおいて、硫酸化の置換率の異なるポリウレタンの合成に成功した。ハードセグメント分率が低いと、やわらかく、使用部位が限定されることが明らかになったので、本年度は、強度が強いポリウレタン (ハードセグメント分率 50% : MDI/PTMO1000/BD 系) から、硫酸化の置換率の異なるポリウレタンの合成法を検討することである。

2. 研究方法

(1) 材料

ハードセグメント分率が 45% の、P2 (MDI/PEO1000/BD)、P4 (MDI/PTMO1000/BD)、および P6 (MDI/PHMO1000/BD) を入手し、使用した。ソフトセグメント鎖は、polyethylene glycol 1000、polytetramethylene glycol 1000、および polyhexamethylene glycol 1000 を入手し、使用した。P2、P4、および P6 を合成するための触媒には、Stannous 2-ethyl-hexanoate を使用した。

pellethane 75D (ハードセグメント分率 : 50%) を入手し、ウレタン結合の水素部位にプロパンスルホン酸を導入して硫酸化ポリウレタンを合成した。

(2) V79 代謝協同阻害試験法 :

Yotti らが、約 20 年前にこの方法を発表し、化学物質について試験している。彼らの方法では、多くの培地と材料が必要なので、我々は、12 穴のプレートおよび 22mm のシャーレを用いて試験できる方法に改変した。本試験系は、細胞毒性と、代謝協同に及ぼす影響、すなわち細胞間連絡阻害活性の 2 種の試験を行って判定する。細胞毒性の影響がない

条件下でのみ、細胞間の連絡機能の有無を判定できるからである。V79 代謝協同阻害試験は、V79 細胞（野生株）80000 個と TG1 細胞（変異株）100 個の細胞をプレート内に 5 時間程度接着させ、6-thioguanine(6-TG)10 μ g/ml の濃度下、37℃炭酸ガス培養器で 7 日間培養する。この培養過程で、野生株は 6-TG を代謝して細胞毒性のある化合物に変換し、自分自身の細胞死を招くが、接触し、細胞間連絡をしている変異株にも毒性物質をギャップ結合を介して渡すため、渡された細胞も死ぬ運命となる。しかし、ここで、ギャップ結合が阻害され、変異株に毒性物質が到達しなかったとき、変異株自身には、6-TG を毒性物質に変換する酵素が欠損しているため、そのまま生き続け、コロニーとなる。

従って、変異株のコロニーが増加すればするほど、細胞間連絡機能の阻害作用は強いことになる。本法の培養期間は 7 日間である。培養終了後、コロニーを染色し、カウント後、統計処理を行う。コントロール群に比べて有意に変異株が増加した場合を代謝協同阻害活性陽性と判定している。

一方、細胞毒性は、変異株である TG1 細胞 100 個の細胞を 12 穴プレートまたは 22 mm のシャーレにまいて、5 時間接着させ、試験化合物を添加した培地を加えた後、6-thioguanine (6-TG)10 μ g/ml の濃度下で、37℃炭酸ガス培養器で 7 日間培養した時、形成されたコロニー数により、細胞毒性を評価した。すなわち、培地のみで形成されたコロニー数の平均を 100 %とした時、試験化合物あるいは、試験材料上で、形成されたコロニー数を百分率 (%) であらわして細胞毒性の指標とした。

(3)分析

FT-IR 分析：原料ポリウレタンおよび合成した硫酸化ポリウレタン材料の表面解析は、顕微透過法（ダイヤモンドセル使用）により FT-IR を測定した。機種は、日本電子製 JIR-5500 を使用し、分解能 4cm^{-1} 、積算回数 100 回で測定した。

ESCA 測定：原料ポリウレタンおよび合成した硫酸化ポリウレタン材料表面の ESCA 測定は、ヤナコ製 CHN MT-5 型および平沼製 XS COMTIT-7 型を使用した。

3. 研究結果

PU の構造と細胞間連絡機能および細胞毒性強度結果

P2 を 31、62 および 125 μ g を各々直径 22mm のガラスシャーレにコートし、コート材料表面で、TG1 細胞毒性試験および V79 代謝協同阻害試験を行った（図 1）。その結果、試験に使用したコート量である 125 μ g で上では、コントロールの 75 %程度のコロニー形成を認めた。この原因は、材料界面に存在するソフトセグメント部分の polyethylene glycol 鎖が負電荷をおびた親水性基に富むため、細胞接着が低下した。

一方、代謝協同阻害活性は、試験したいずれのコート量でも検出されなかった（図 1）。

P4 では、0.5、1、2 mg を各々直径 22 mm のガラスシャーレにコートし、コート材料表面で、V79 代謝協同阻害試験を行った（図 2）。その結果、試験した 0.5mg/dish で有意に高い変異株 (TG1) 細胞のコロニー数が増加した。従って、コート量 0.5mg/dish 以下でギャップ結合細胞間連絡阻害作用があることが判明した。細胞毒性は、コート量が増加するに伴って、コロニー形成が低下し、若干強くなる傾向が認められた（図 2）。

P6 では、0.5、1、2 mg を各々直径 22 mm のガラスシャーレにコートし、コート材料

表面で、V79 代謝協同阻害試験を行った (図 3)。その結果、いずれのコート量でも V79 代謝協同阻害活性が認められなかった。細胞毒性も、試験したコート量では、有意に高い細胞毒性は検出されなかった (図 3)。

次に、P2、P4、P6 のポリウレタン合成時に使用した触媒である stannous 2-ethyl-hexanoate の V79 代謝協同阻害試験を行った結果、試験した濃度でいずれも阻害活性が検出されなかった。細胞毒性は、 $20 \mu\text{g/ml}$ でコントロールの 30 % 近くまで低下し、細胞毒性が比較的強い化合物であることが判明した (図 4)。

次に、P2、P4 および P6 を構成するソフトセグメントポリオール の V79 代謝協同に及ぼす影響を調べた。PEO1000 の場合には、 20mg/ml の濃度まで、添加して試験した結果、V79 代謝協同阻害活性も細胞毒性も検出されなかった (図 5)。

PEO のエチレンに比べて炭素数が 1 つ増えた polypropylene glycol 1000 の代謝協同阻害試験を行った結果、 $200 \mu\text{g/ml}$ で 1 点のみで有意に細胞間連絡阻害能を示したため、擬陽性と判定した (図 6)。細胞毒性は、 $200 \mu\text{g/ml}$ では認められなかったものの、 $400 \mu\text{g/ml}$ ではコントロールの 15 % 程度のコロニーしか形成されず、強い細胞毒性を示すことが明らかになった (図 6)。

polypropylene glycol 1000 に比べて炭素数が更に 1 つ増えた PTMO1000 では、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ から有意に高い代謝協同阻害活性があることが明らかになった (図 7)。細胞毒性は $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度以下では、検出されなかった (図 7)。

炭素数 6 のポリエーテル鎖の繰り返し構造からなる PHMO1000 では、試験した濃度範囲 ($0.5\text{--}2 \mu\text{g/ml}$) で、代謝協同阻害活性は検出されなかった。細胞毒性は $2 \mu\text{g/ml}$ までの濃度では、検出されなかった (図 8)。

硫酸化ポリウレタンの合成

窒素含量が 5.8% の PU について、ウレタン結合のプロトン をプロパンスルトンで置換するために、NaH でウレタン結合のプロトン を目的の硫酸化置換率と同じ Na 置換率になるように、NaH を添加し、それに対応するプロパンスルトン量を加え反応させ、Na 部位 をプロパンスルトンで置換することとした。

すなわち、PU を DMF に溶解後、 $0 \text{ } ^\circ\text{C}$ に冷却し、所定量の NaH を加えた。次に、 $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ に加温し、プロパンスルトン を所定量加えて反応させた。室温で水中に滴下し、ポリマー を沈殿させ、数回洗浄した。減圧乾燥し、硫酸化 PU を得た。

合成された物質について FT-IR (図 9) および元素分析 (表 1) を行った。ウレタン結合の水素に由来する 3300cm^{-1} が、原料 PU に比べてプロパンスルトンの仕込量の多い Lot1、Lot2 および Lot3 では吸収が次第に減少していた (図 9)。従って、ウレタン結合の水素部位にプロパンスルホン酸が導入できた。元素分析において S はすべてプロパンスルホン酸基に由来する。N はすべてポリウレタンのウレタン結合部位に由来する。モル比から、N の置換率を求めた結果、Lot1 は 6.2%、Lot2 は 13.2%、Lot3 は 24.4% 置換している材料であることが判明した。

4. 考察

PU の構造と細胞間連絡機能および細胞毒性強度

P2 および P6 は、細胞間連絡阻害活性は陰性であり（図 1、3）、これらのポリウレタンを構成するソフトセグメント鎖 PEO1000 および PHMO1000 について試験した結果、同様に陰性であった（図 5、8）。

P4 はソフトセグメントの構成ポリオールとして PTMO1000 を有するが、PTMO は、ポリアルキルエーテル型ポリオールの 4 種の中で唯一細胞間連絡阻害活性を示した化合物である。炭素数 2 (PEO1000)、3 (polypropylene glycol 1000) および 6 (PHMO1000) では細胞間連絡を阻害せず、炭素数 4 の PTMO1000 のみの特異的に細胞間連絡を阻害する理由は明らかではない。しかし、細胞膜中にあるギャップ結合連絡を形成しているコネキシン蛋白との相互作用が PTMO1000 が有する物理化学的性質において最も阻害的に作用しやすい結果をもたらすためであろう。PEO1000 や polypropylene glycol 1000 では、極性が高く、負に荷電したエーテル性の酸素の荷電密度が高いため、細胞膜との相互作用が生じにくい。そのため、ギャップ結合連絡機能が妨げられなかったものと考えられる（図 5、6）。

PTMO1000 では、同様に負に荷電したエーテル性の酸素が存在するものの、テトラメチレン基が適度に脂溶性に富むため、細胞膜との相互作用を生じ、その結果、ギャップ結合連絡機能が阻害されたものと考えられた（図 7）。

PHMO1000 では、ヘキサメチレン基ゆえに、PTMO1000 よりも脂溶性が高く、溶液状態で解けにくくなるために、ギャップ結合細胞間連絡機能に及ぼす影響を検出しにくい可能性がある（図 8）。PHMO1000 をソフトセグメントの構成成分として有する P6 の場合材料表面でも代謝協同阻害活性が検出されなかった。PHMO1000 が細胞膜と接しても相互作用しない可能性が考えられる。

これらのポリウレタンの合成に使用された触媒には、細胞間連絡を阻害する活性が検出されなかった事より、溶出性の低分子からなる触媒には、細胞間連絡阻害活性がないものと考えられる（図 4）。

硫酸化ポリウレタンの合成

ハードセグメント分率 50 % のポリウレタンについて、ウレタン結合の水素部位に 6.2、13.2、および 24.4 % の置換率でプロパンスルホン酸を導入できた。現在、合成した硫酸化ポリウレタンの *in vitro* 試験での確認を行っている。

5. 結論

ソフトセグメントの炭素数が異なるポリアルキルエーテルポリウレタンについて、V79 代謝協同阻害試験を実施した。その結果、ソフトセグメントが PEO1000、polypropylene glycol 1000、及び PHMO1000 からなるポリウレタンはいずれも細胞間連絡を阻害せず、これらのポリオール単独でも細胞間連絡を阻害しないことが明らかになった。しかし、PTMO1000 からなるポリウレタンは V79 代謝協同阻害活性を示し、PTMO1000 単独でも細胞間連絡を強力に阻害することが明らかになった。

ハードセグメント分率が 50 % のポリエーテルポリウレタンに、3 段階の置換率でプロパンスルホン酸を導入できた。

6. 研究発表

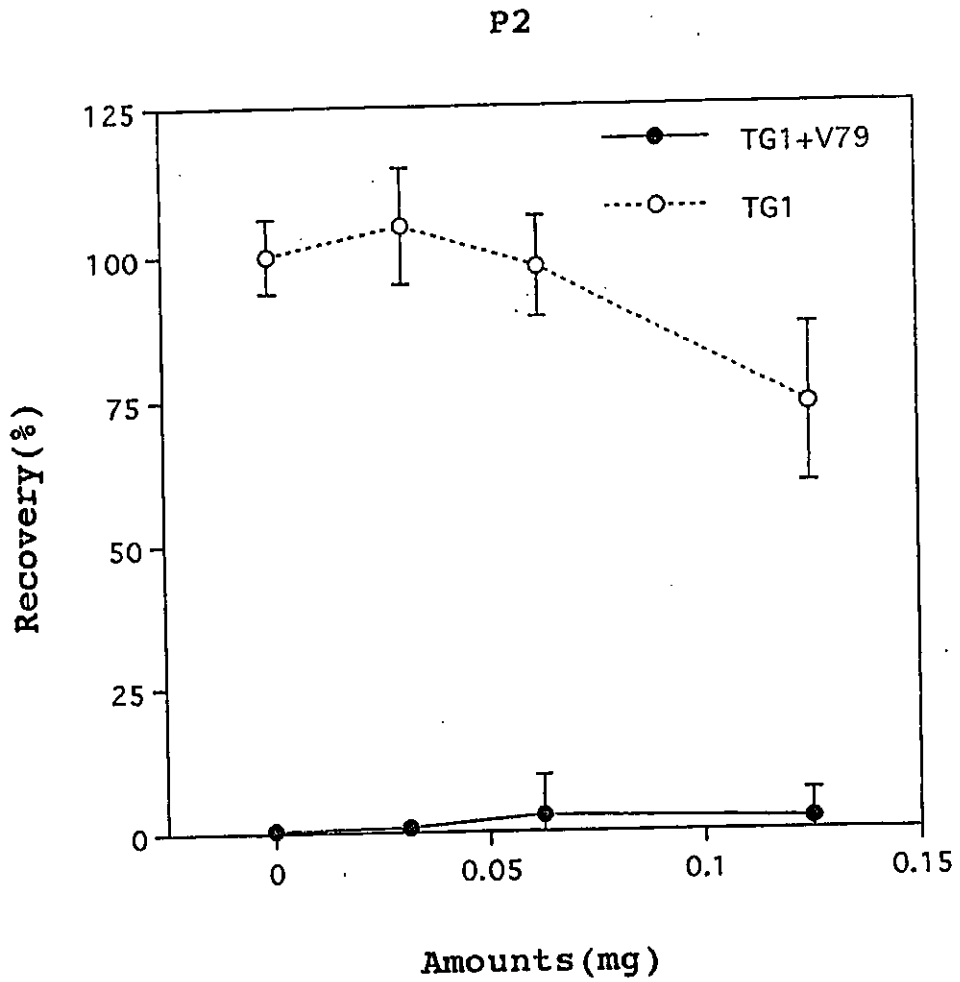


図1. P2のコート量とV79代謝協同阻害との関係

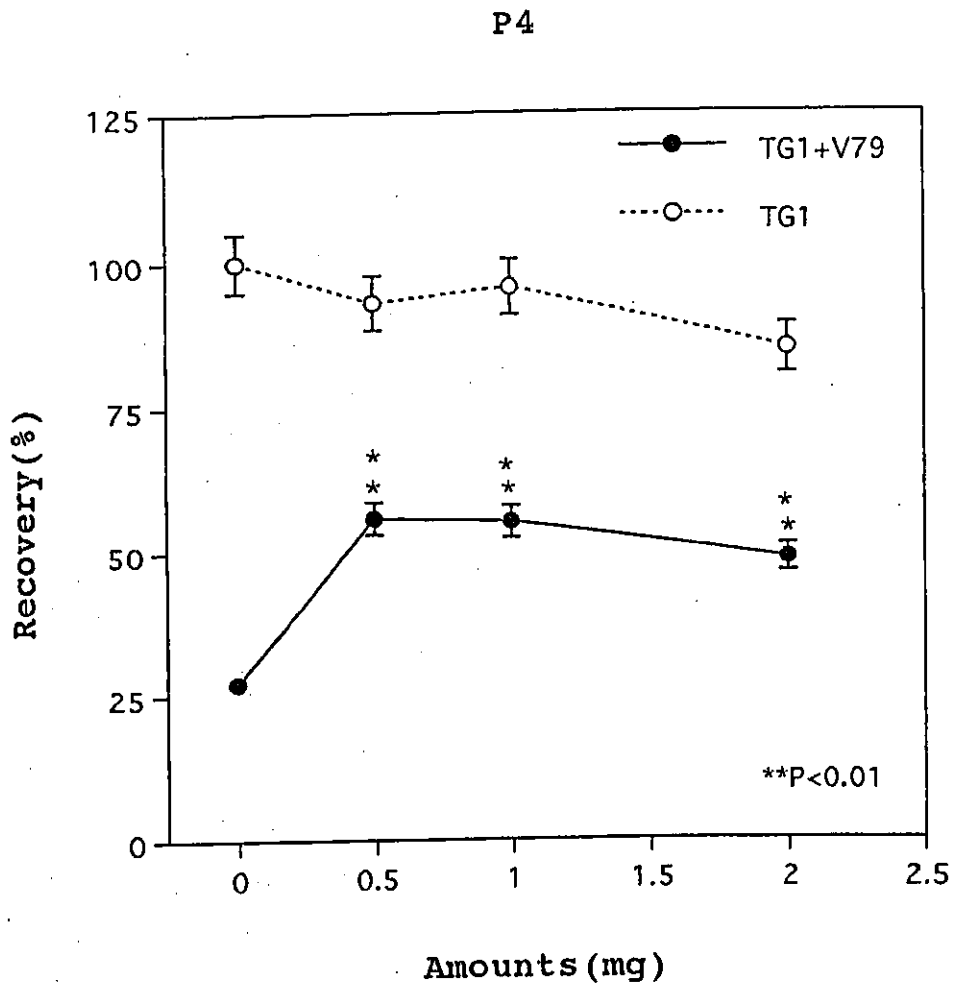


図2. P4のコート量とV79代謝協同阻害との関係

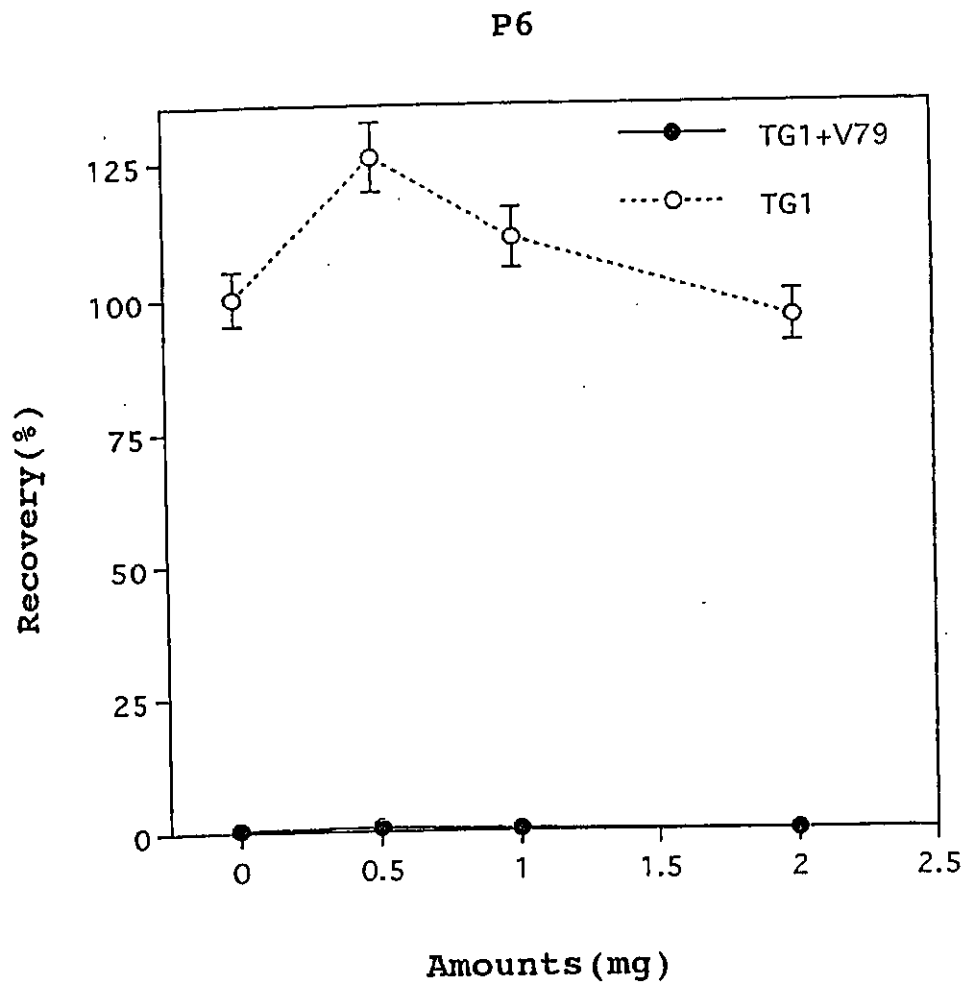


図3. P6のコート量とV79代謝協同阻害との関係

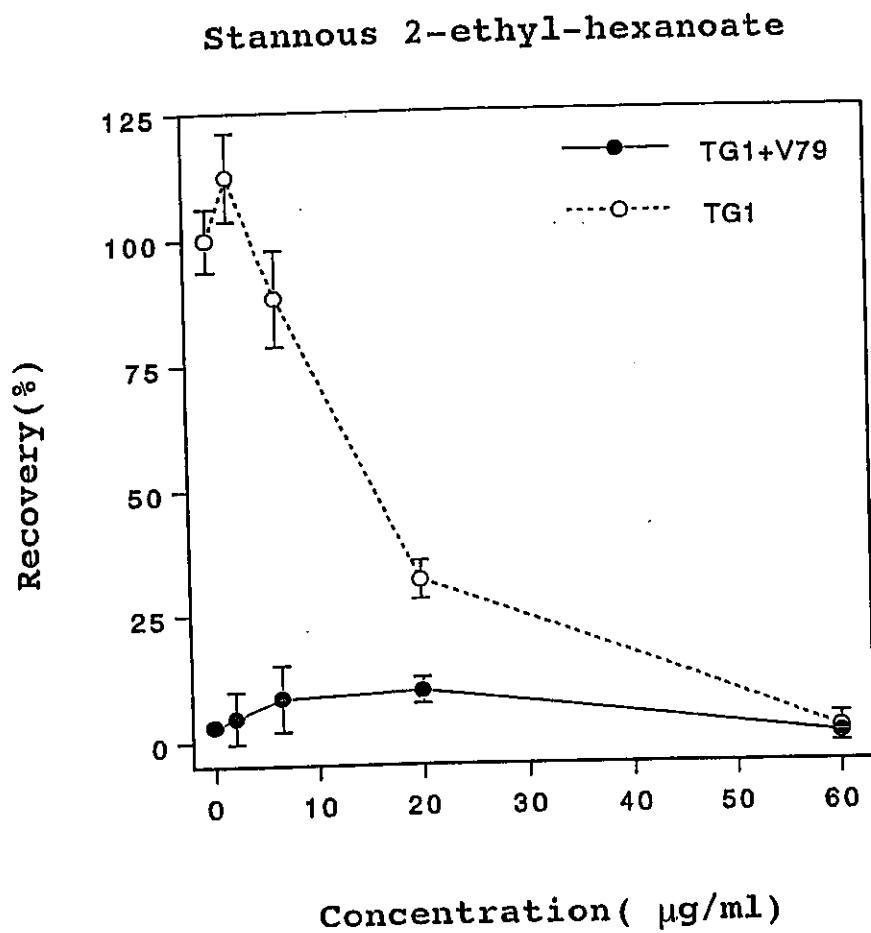


図4. Stannous-2ethyl-hexanoate のV79代謝協同
阻害作用

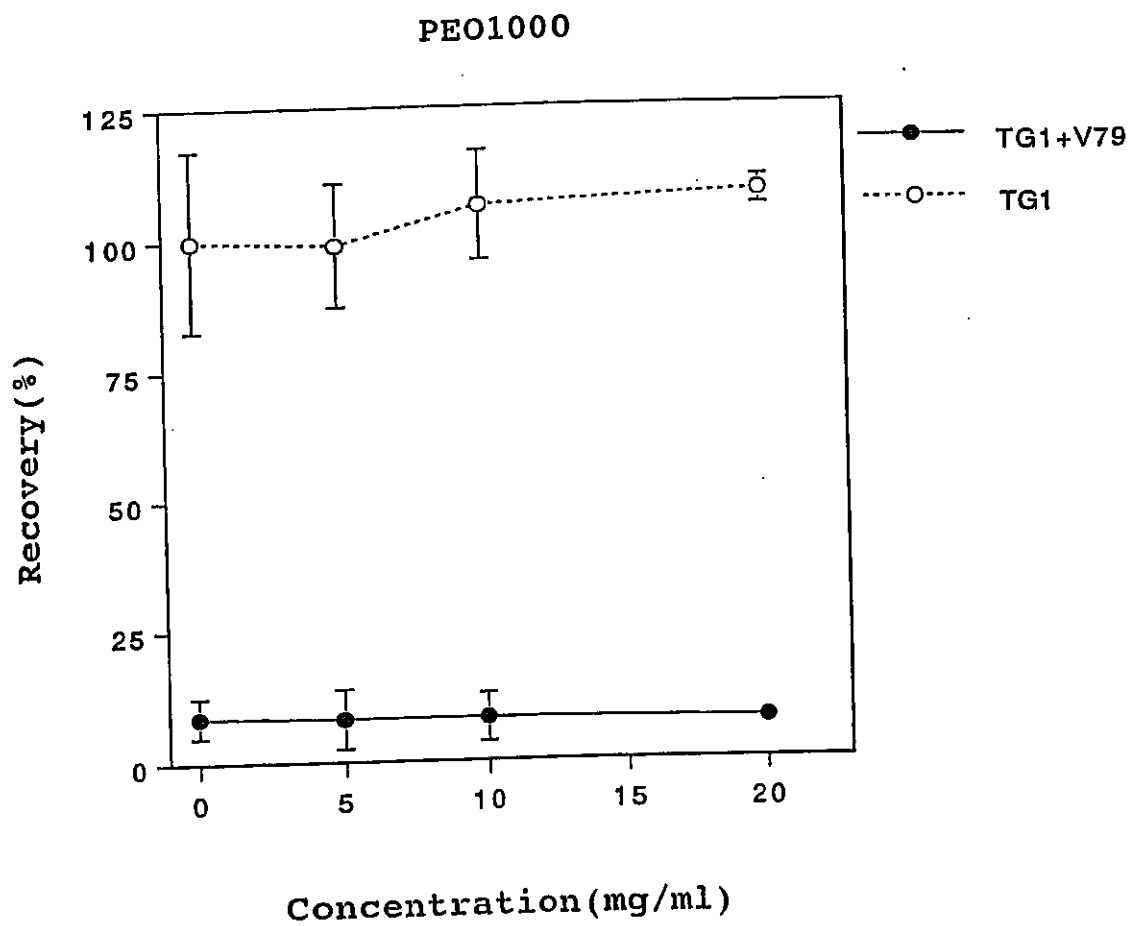


図 5. PEO1000 の V 7 9 代謝協同阻害作用

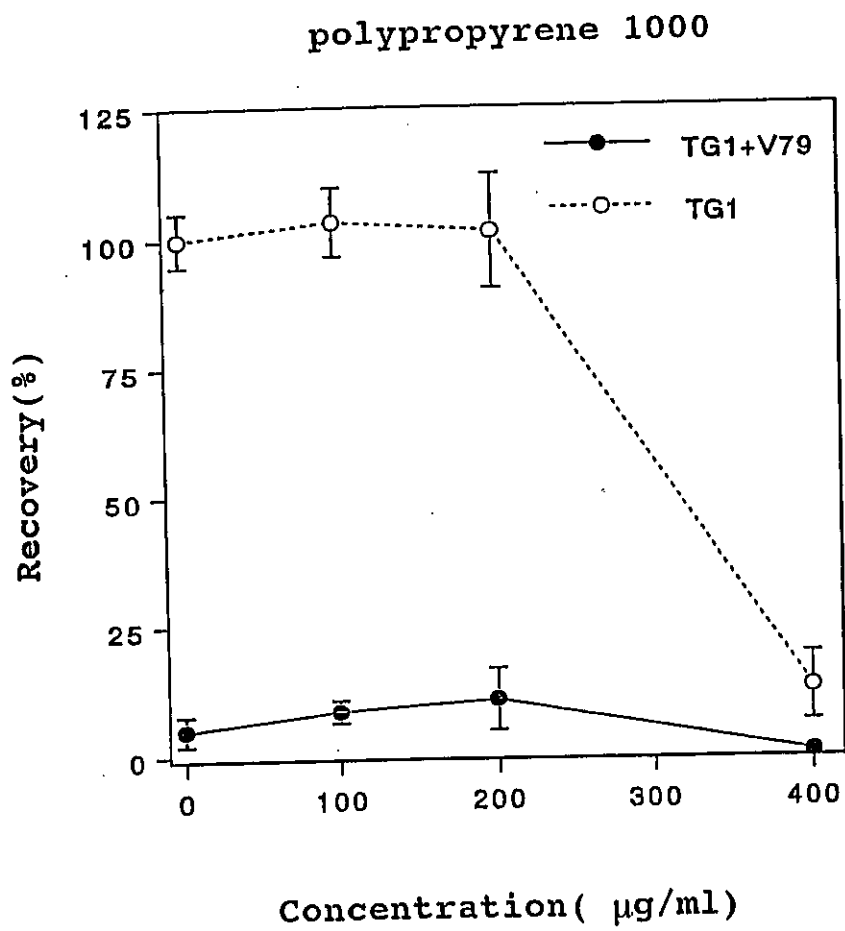


図 6. polypropylene glycol 1000 の V 7 9 代謝協同阻害作用

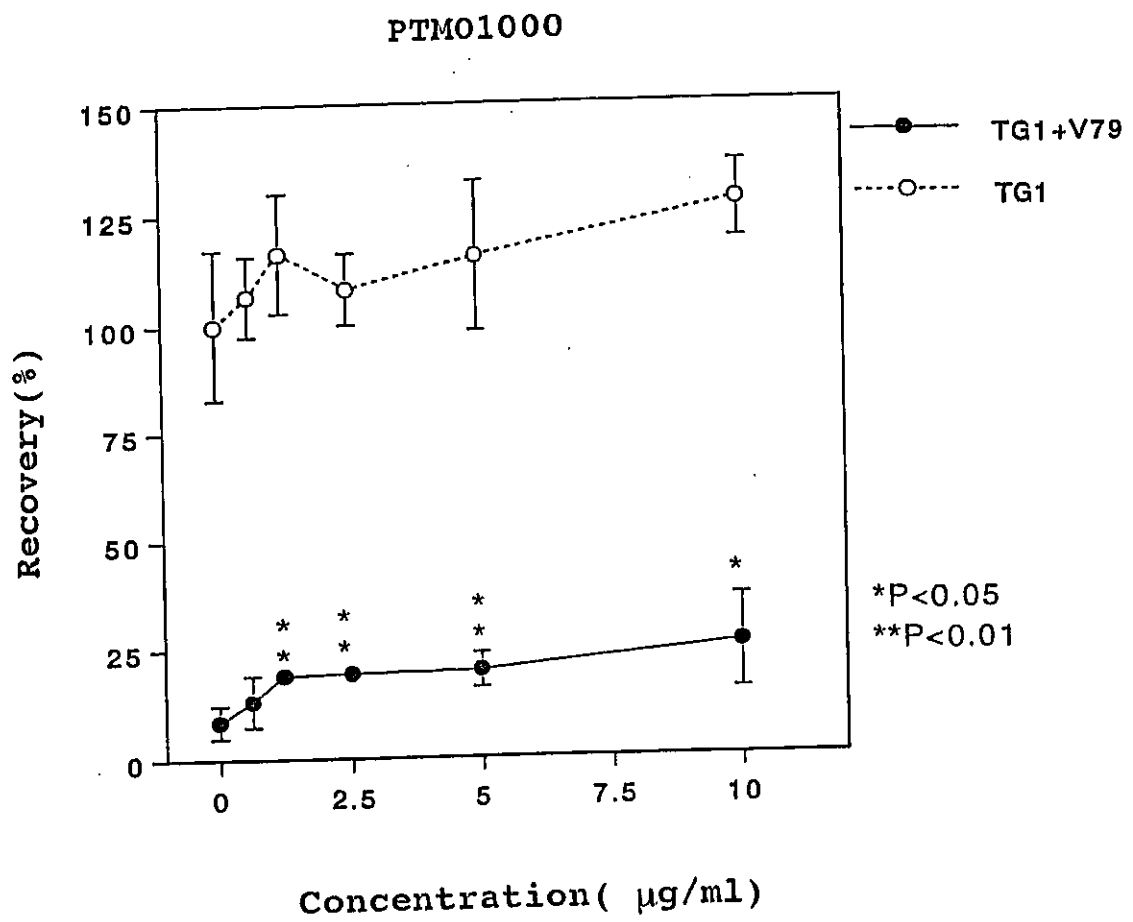


図7. PTMO1000 のV79代謝協同阻害作用