

表 3. IL-6 産生誘導活性に対するエンドトキシニンヒビターの阻害効果

エンドトキシン インヒビター		IL-6 (pg/ml) *1		
濃度 (µg/ml)	エンドトキシン標準品 溶液 (500 EU/ml)	製品 7 抽出液	製品 9 抽出液	
-	-	8,910	16,960	9,850

0	0	5,880	18,100	10,990
1	1	5,970	18,210	9,710
10	10	1,430	19,610	8,860
100	100	69	3,290	2,700

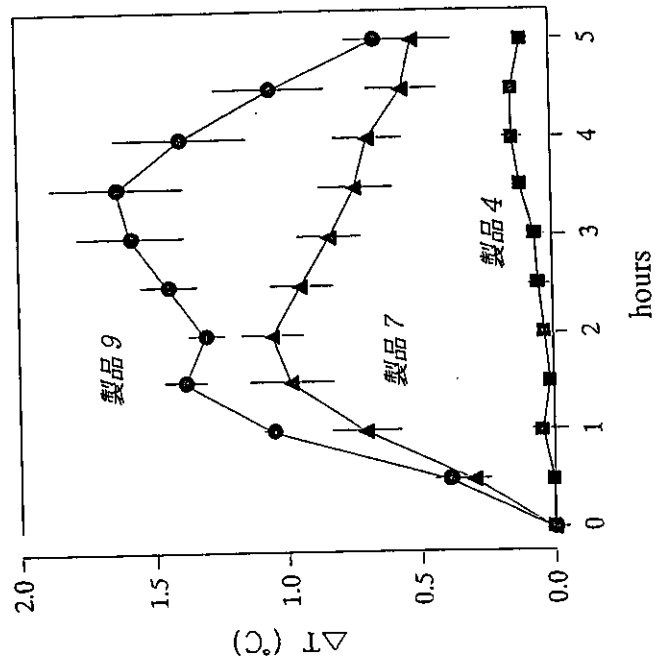
0	0	5,210	15,900	8,600
1	1	N.D. *2	N.D.	2.4
10	10	N.D.	N.D.	N.D.
100	100	N.D.	N.D.	N.D.

*1, MM6-CA8 細胞培養上清中の濃度; *2, 検出限界以下 (0.7 pg/ml)

表4. エンドトキシン活性（リムルス活性）に対する CAP-18 の阻害効果

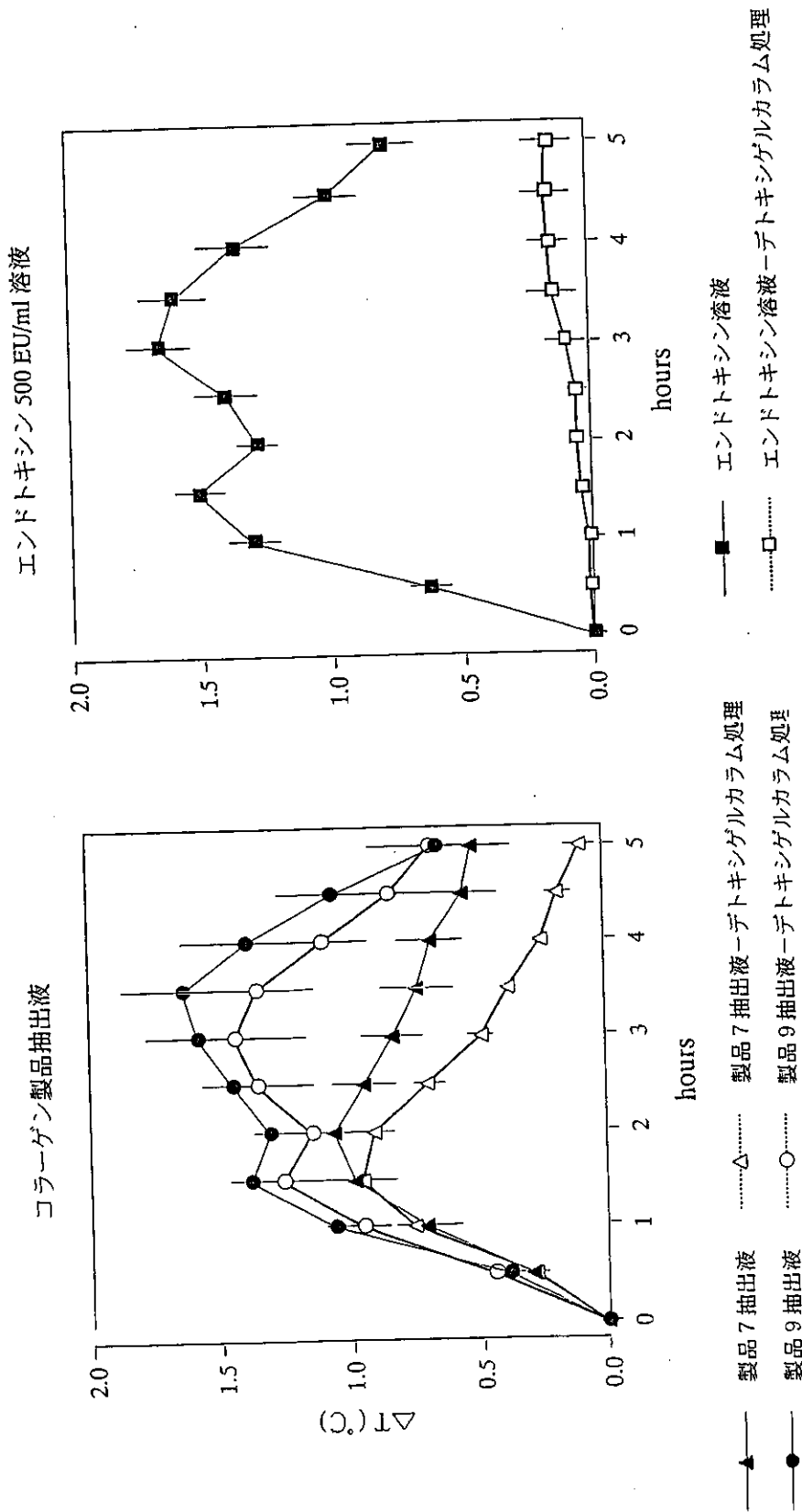
試料	CAP-18 ($\mu\text{g/ml}$)	リムルス活性	
		EU/ml	% control
エンドトキシン 標準品溶液 (100 EU/ml)	0	11.5	100
	1	10.4	90.2
	10	1.9	16.5
	100	3.8	33.0
製品7抽出液	0	1.23	100
	1	0.96	78.0
	10	1.03	83.7
	100	0.5	40.7
製品9抽出液	0	31.8	100
	1	25.5	80.1
	10	30.7	96.5
	100	3.2	10.1

図1. コラーゲン製品抽出液のウサギに対する発熱活性



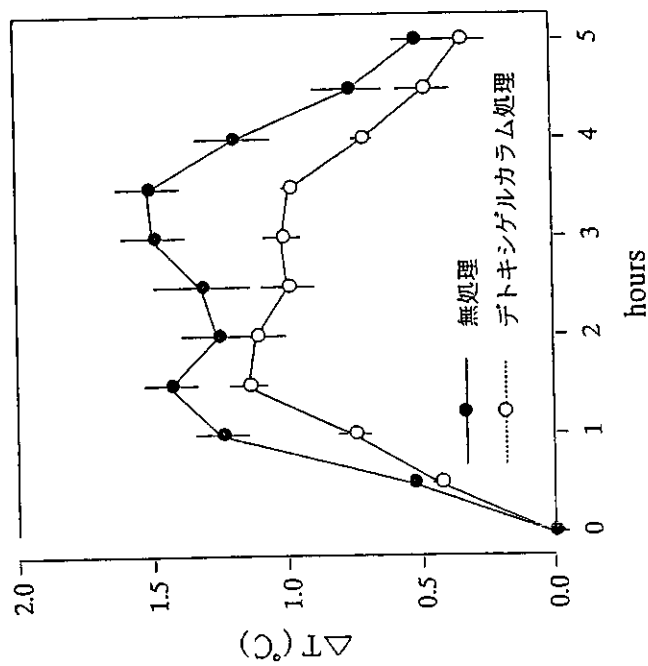
3種類のコラーゲン製品の抽出液をウサギの体重1kg当たり1ml 静脈内投与した
(n = 4, Mean ± S.E.)。

図2. デトキシゲルカルラム処理による発熱活性の減弱



コラーゲン製品抽出液あるいはエンドトキシン溶液をデトキシゲルカルラムに4回繰り返し通して通したのち (カラム1本当り抽出液 5 ml)、ウサギに 1 ml/kg 静脈内投与した。対照として処理前の試料液を同様に投与した。n = 4, Mean ± S.E.

図3. 製品4抽出液によるデトキシゲルカラムのエンドトキシニン除去能力の低下



製品4抽出液にエンドトキシニン標準品を添加し(終濃度 500 EU/ml)、デトキシゲルカラムに4回繰り返して通したのち、ウサギに静脈内投与した。対照として、デトキシゲルカラム処理前の試料液を同様に投与した。n=4, Mean ± S.E.

図4. コラーゲン製品9のKDO分析

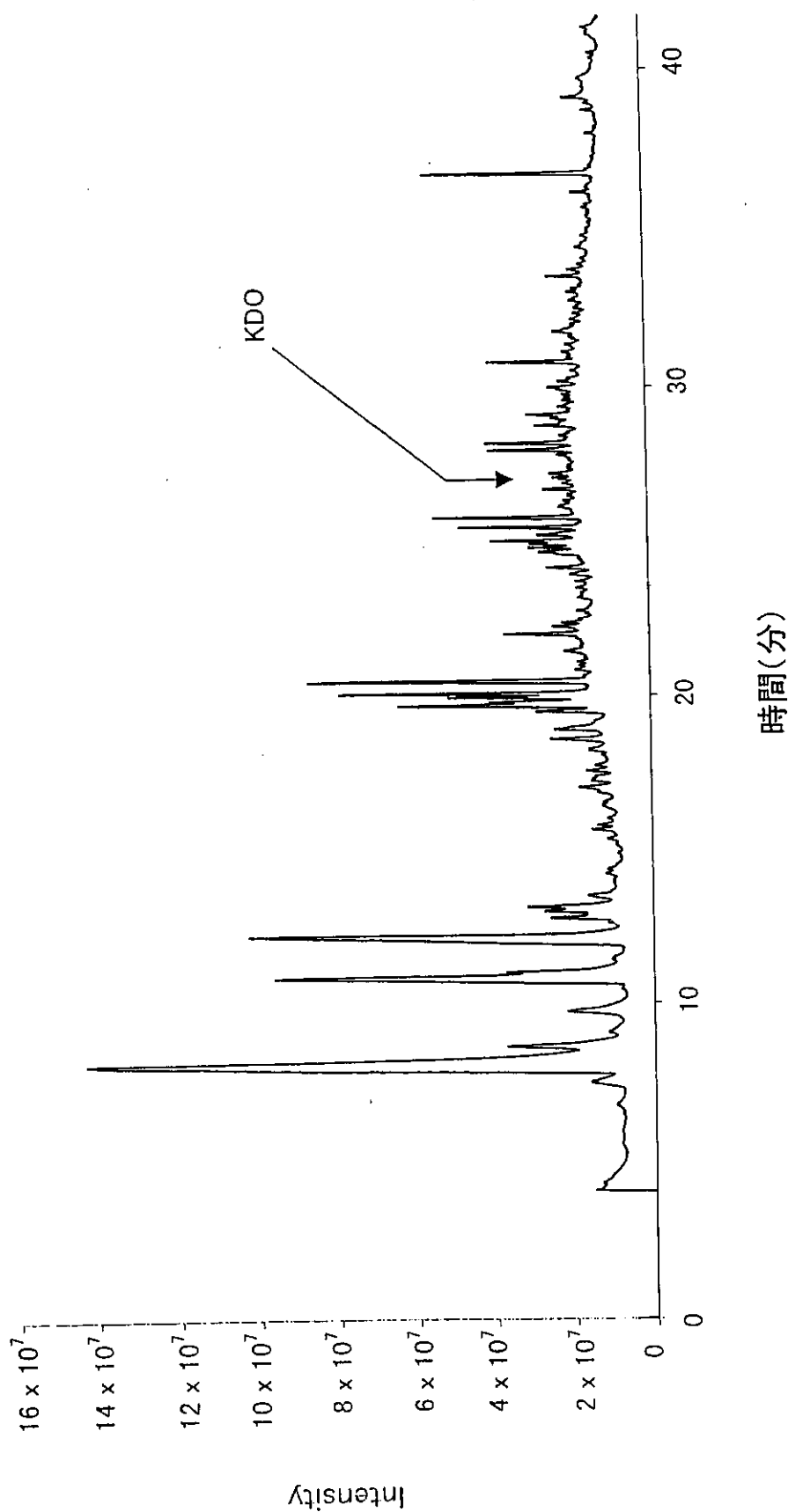
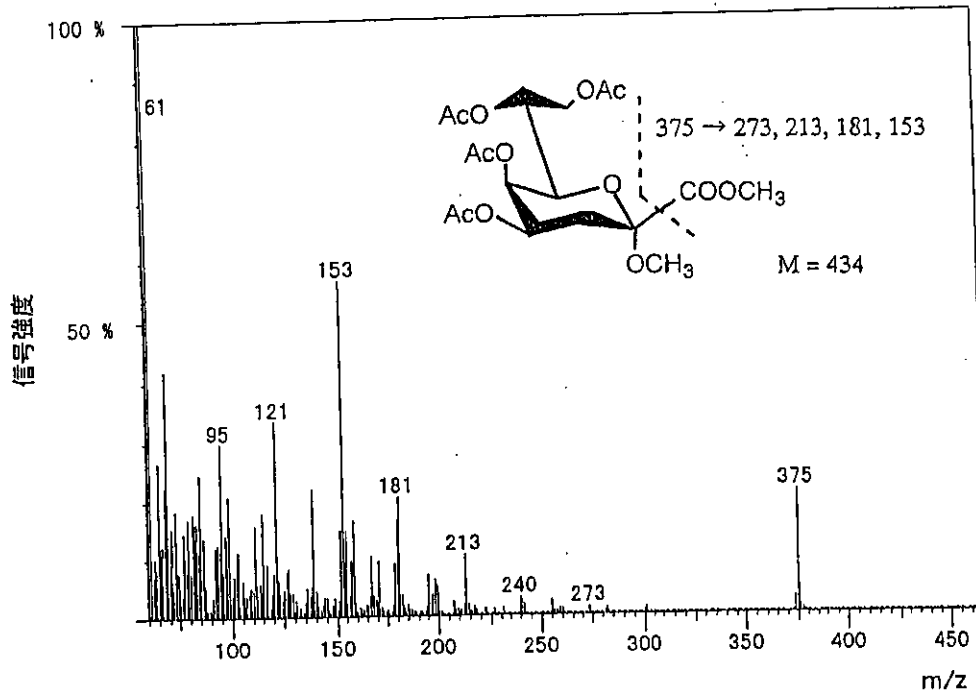
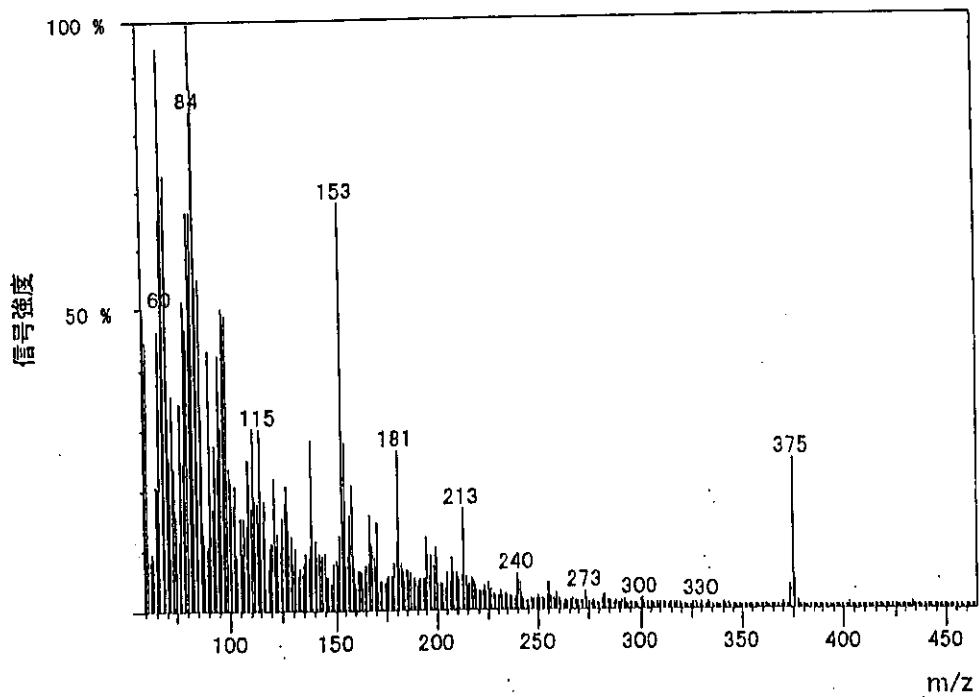


図5. KDO-メチル・アセチル誘導体のマススペクトル

A) 大腸菌エンドトキシン



B) コラーゲン製品9



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）

平成11年度分担研究報告書

分担研究課題

「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

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）
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

分担研究者 土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所・療品部第三室長

研究要旨 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。本年度は、ソフトセグメントが炭素数 2 のエチル基、炭素数 4 のテトラメチル基、炭素数 6 のヘキサメチル基のポリエーテルからなる規則性のあるソフトセグメントで構成されたセグメント化ポリウレタンについてインビトロ評価を行なった。また、ハードセグメントの分率が 50 % のセグメント化ポリウレタン（MDI/PTMO1000/BD）において、硫酸基の置換率の異なるポリウレタンの合成法を検討し、6 %、13 % および 24 % 置換率の硫酸化ポリウレタンの合成に成功した。

A. 研究目的

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。

B. 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 glycol1000 (PEO1000)、polytetramethylene glycol 1000 (PTMO1000)、および polyhexamethylene glycol 1000 (PHMO1000)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。

pellethane75D (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ブ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。

C. 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 μg 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 μg 以上では、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ポリエチルエーテル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阻害活性は検出されなかった(図1)。

P4では、0.5、1、2 mg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、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22mm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)。

それでは、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(0.5-2 $\mu\text{g/ml}$)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 °C に冷却し、所定量の NaH を加えた。次に、50 °C に加温し、プロパンスルトン在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。

D. 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)、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 (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 1000) および 6 (PHMO1000) では細胞間連絡を阻害せず、炭素数 4 の PTMO1000 のみが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による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 (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る (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。

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。

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

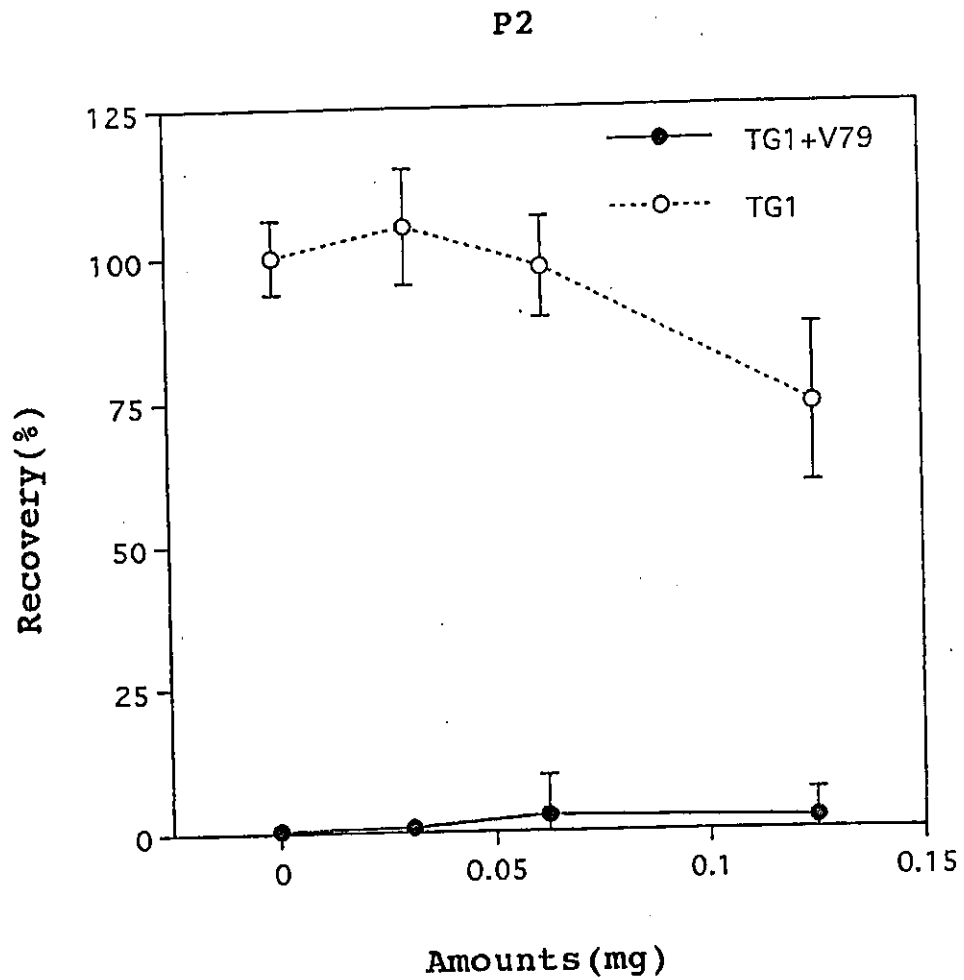


図1. P2のコート量とV79代謝協同阻害との関係

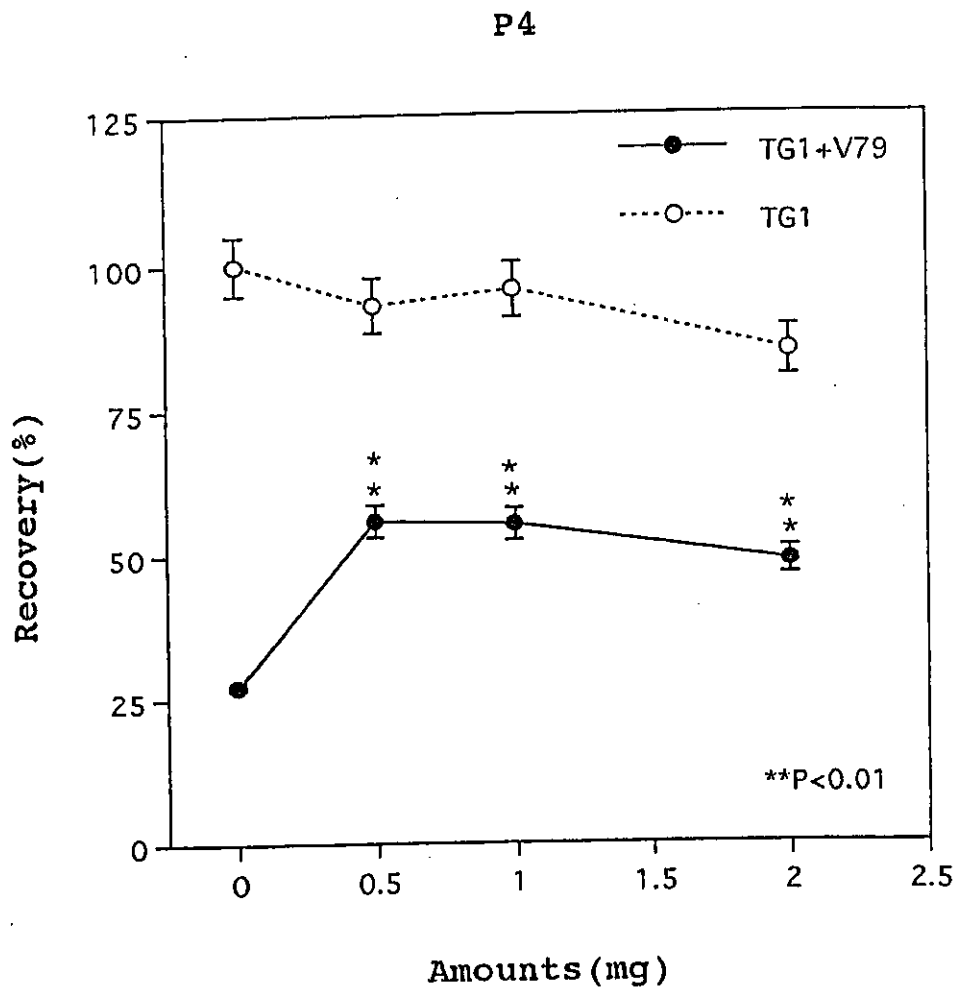


図2. P4のコート量とV79代謝協同阻害との関係

P6

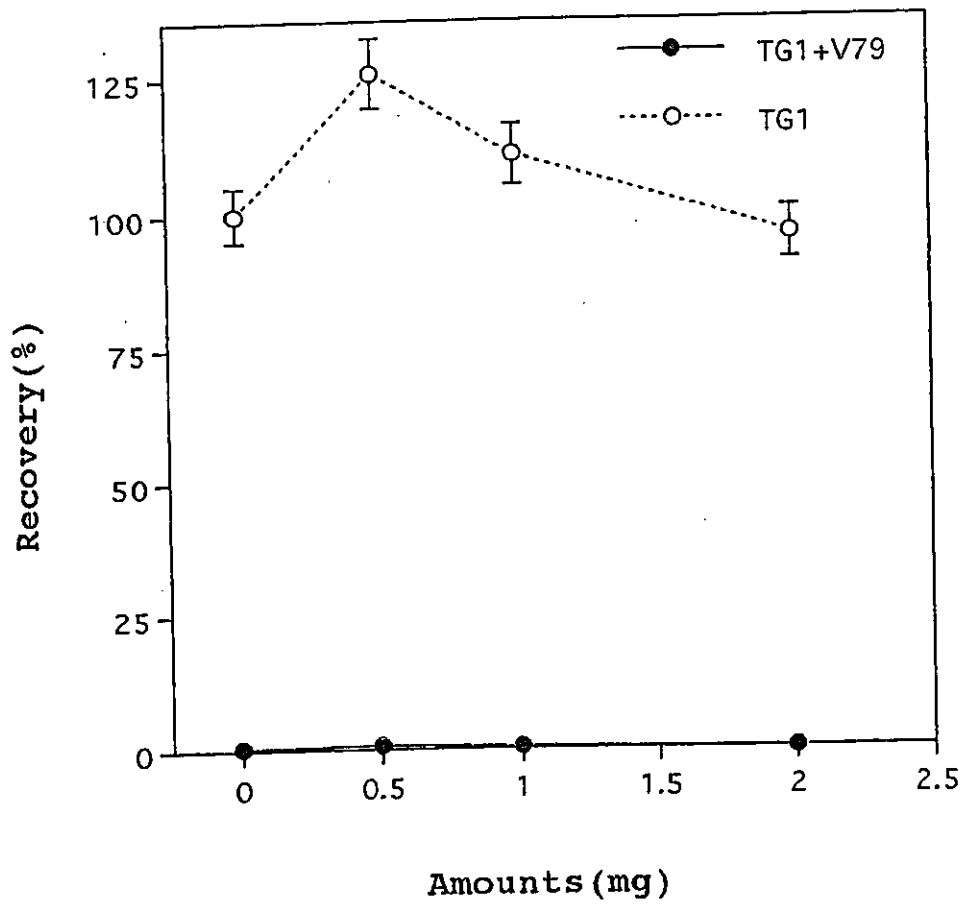


図3. P6のコート量とV79代謝協同阻害との関係

Stannous 2-ethyl-hexanoate

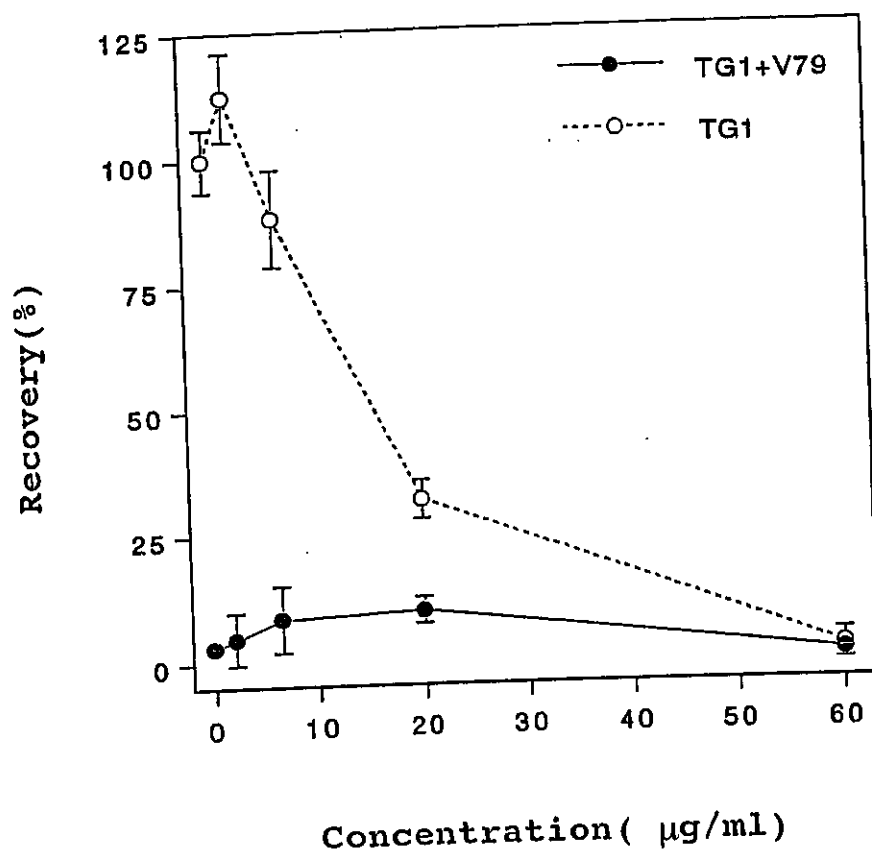


図4. Stannous-2ethyl-hexanoate のV79代謝協同
阻害作用

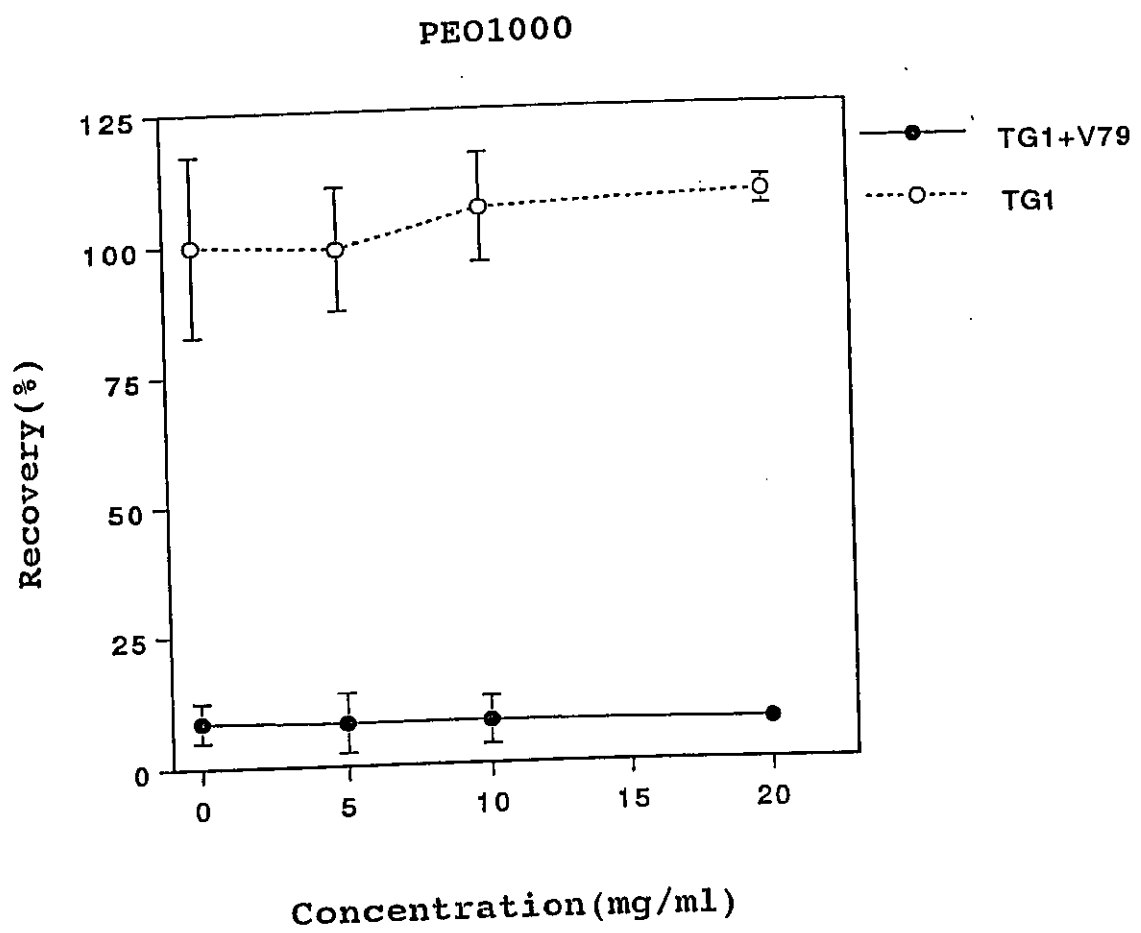


図5. PEO1000 の V 7 9 代謝協同阻害作用

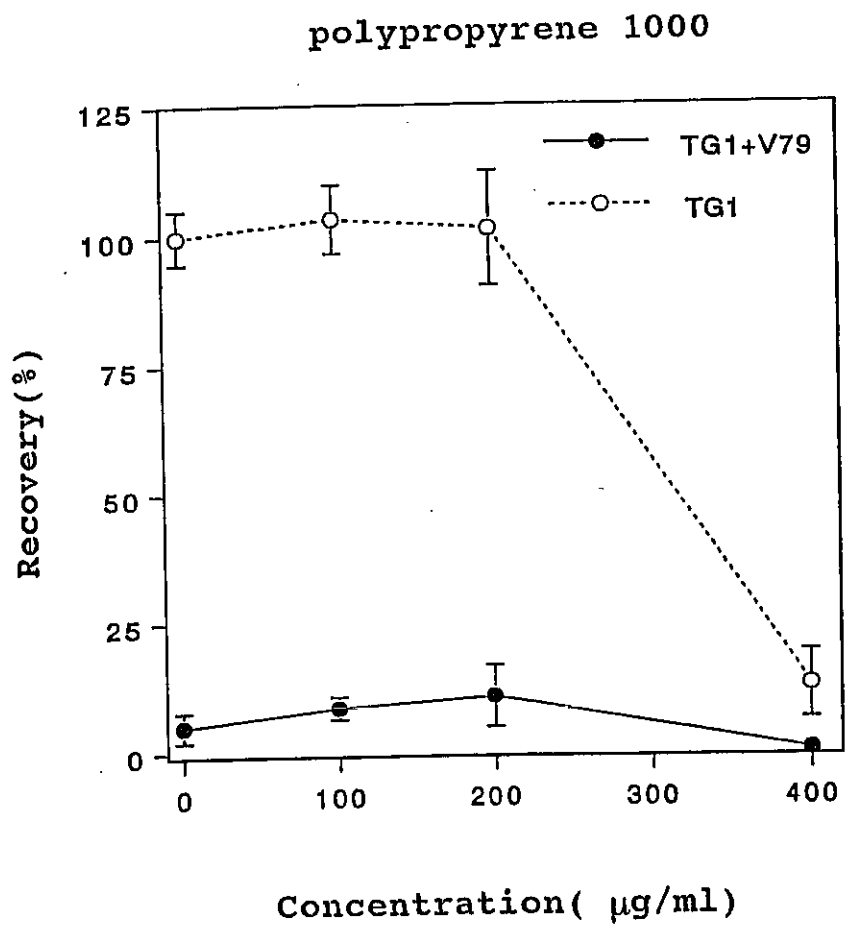


図 6. polypropylene glycol 1000 の V 7 9 代謝協同阻害作用

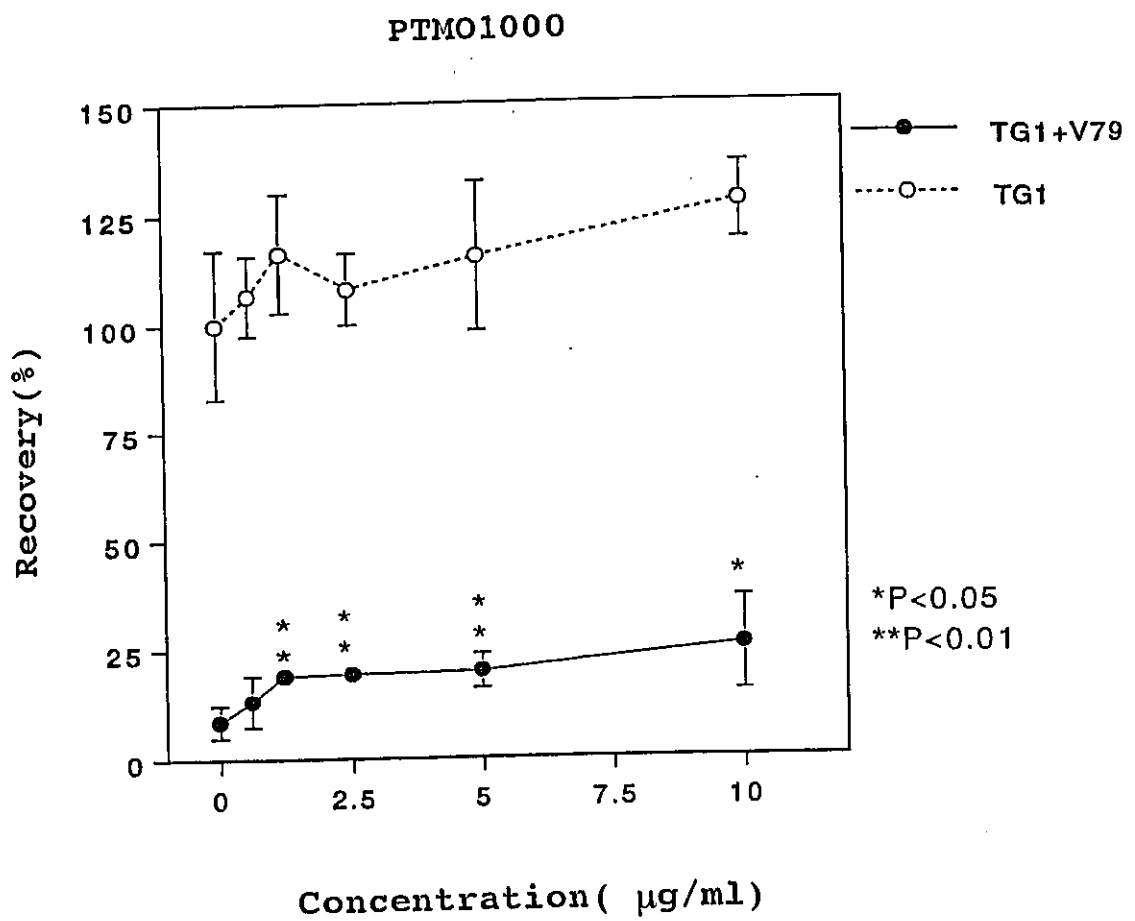


図7. PTMO1000 のV79代謝協同阻害作用