

表1. Ovalbumin (OVA)投与量と脾臓重量の変化

Group	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Relative weight (Spleen/Body ×1000)
Alum alone	18.03 ± 0.99	0.117 ± 0.024	6.48 ± 1.03
OVA 0.1 μg	17.61 ± 0.98	0.099 ± 0.003	5.63 ± 0.40
OVA 1 μg	17.72 ± 0.61	0.087 ± 0.011 *	4.90 ± 0.51 *
OVA 10 μg	18.40 ± 1.52	0.118 ± 0.008	6.47 ± 0.69

Groups of mice (n=5) received 200 μl of 10 mg/ml Alum adjuvant - PBS solution containing various amount of OVA by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, spleen was corrected. Each value represent the mean ± standard deviation (SD). * OVA-treated group showed significant difference as compared to Alum-control group (p < 0.05).

表2. OVA投与量の違いが脾臓リンパ球幼若化反応に及ぼす影響

Group	³ HTdR incorporation (dpm)		
	—	ConA	OVA
Alum alone	148 ± 32	1291 ± 536	382 ± 132
OVA 0.1 μg	178 ± 38	1727 ± 891	432 ± 101
OVA 1 μg	180 ± 30	2046 ± 393	565 ± 115
OVA 10	154 ± 32	1981 ± 456	524 ± 127

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, mice were killed and spleen cells were corrected. These cells were stimulated with 2 μg/ml Con A or 100 μg/ml OVA at a final concentration at 37°C for 48 h. After incubation, the cells were pulsed for 4 h with ³HTdR, and ³HTdR incorporation was measured. Each value represents the mean ± SD.

表3. リンパ球増殖反応測定試薬の違いによる結果の変化

(a) WST-8

	Alum (animal 3)		OVA 10 μ g (animal 5)	
	O.D.	% of control	O.D.	% of control
-(Control)	0.326		0.423	
Con A	0.481	147.5	0.642	151.7
OVA	0.373	114.5	0.485	114.6

(b) alamarBlue

	Alum (animal 3)		OVA 10 μ g (animal 5)	
	O.D.	% of control	O.D.	% of control
-(Control)	0.519		ND	
Con A	0.543	104.6	0.496	
OVA	0.537	103.5	0.490	

(c) 3 HTdR

	Alum (animal 3)		OVA 10 μ g (animal 5)	
	dpm	% of control	dpm	% of control
-(Control)	125.4		155.4	
Con A	1823.1	1453.8	2087.7	1343.4
OVA	239.2	190.7	515.6	331.8

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, mice were killed and spleen cells were collected. These cells were stimulated with 2 μ g/ml Con A or 100 μ g/ml OVA or PBS at a final concentration or PBS alone (control) at 37°C for 48 h. After incubation, the cells were pulsed for with 3 HTdR, WST-8 or alamarBlue dyes, and 3 HTdR incorporation or absorbance was measured.

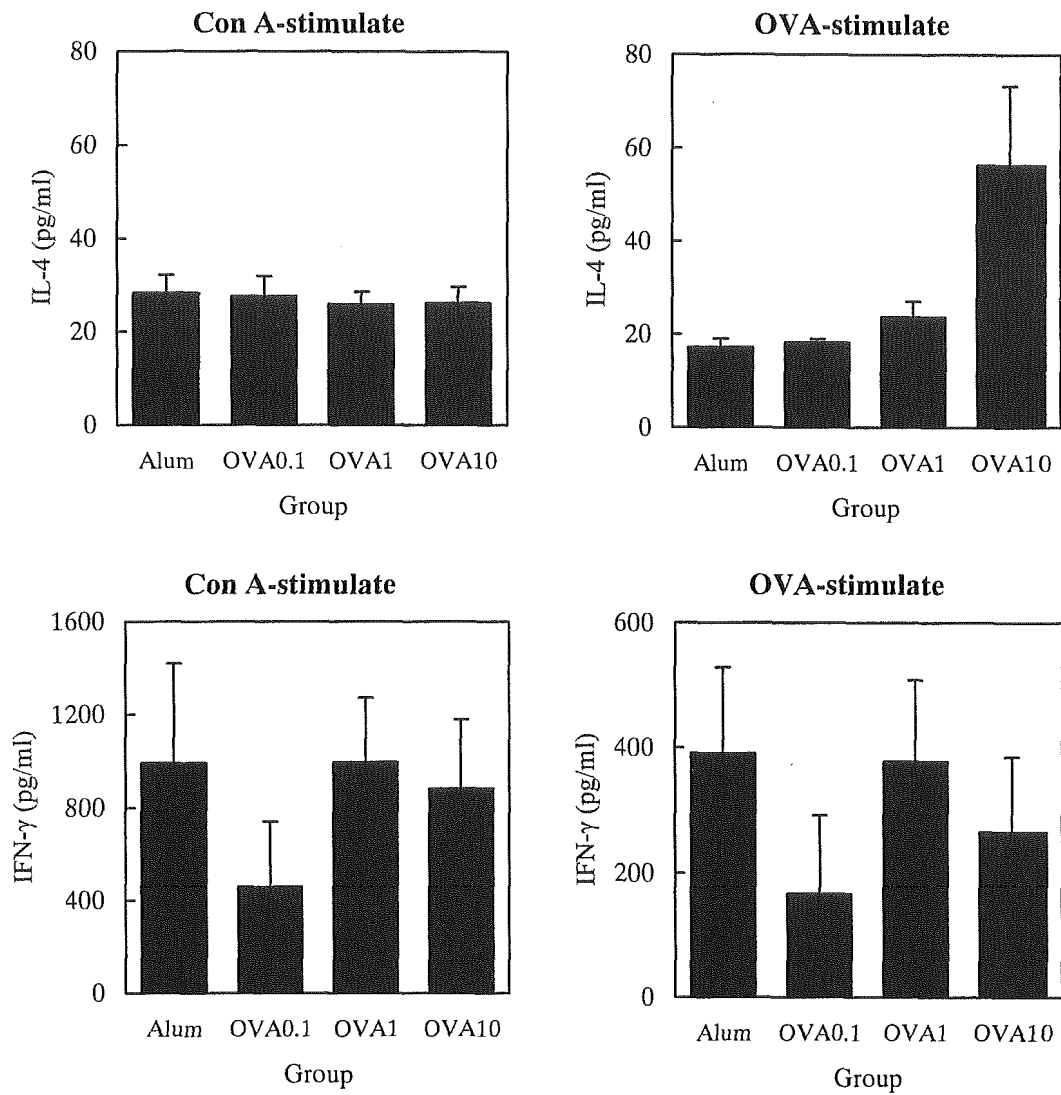
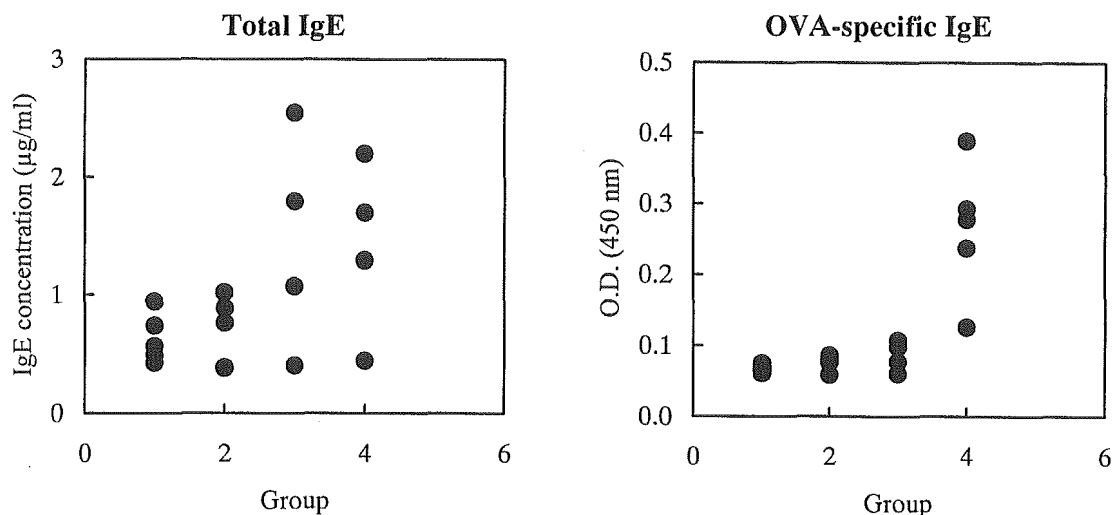


図1. OVA投与量の違いによるサイトカイン産生の変化

Groups of mice (n=5) received 200 μ l of 10 mg/ml Alum adjuvant - PBS solution containing various amount of OVA by intraperitoneal injection. Final concentration of OVA in injection solution was 0 μ g (Alum), 0.1 μ g (OVA0.1), 1 μ g (OVA1) and 10 μ g (OVA10), respectively. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, spleen was collected and the cell suspension was prepared. These cells (5×10^6 cells/1 ml medium) were stimulated with 2 μ g/ml Con A or 100 μ g/ml OVA at a final concentration at 37°C for 48 or 72 h. After incubation, the supernatant was collected and the concentrations of IL-4 and IFN- γ were measured. Each value represent the mean \pm standard deviation (SD).



No.	Group	Total IgE (µg/ml)	OVA-specific IgE (O.D. 450 nm)
1	Alum alone	0.63 ± 0.21	0.069 ± 0.005
2	OVA 0.1 µg	0.69 ± 0.29	0.078 ± 0.011
3	OVA 1 µg	1.38 ± 0.82	0.084 ± 0.019
4	OVA 10 µg	1.38 ± 0.64	0.265 ± 0.095

図2. OVA投与量の違いが血清IgE抗体価に及ぼす影響

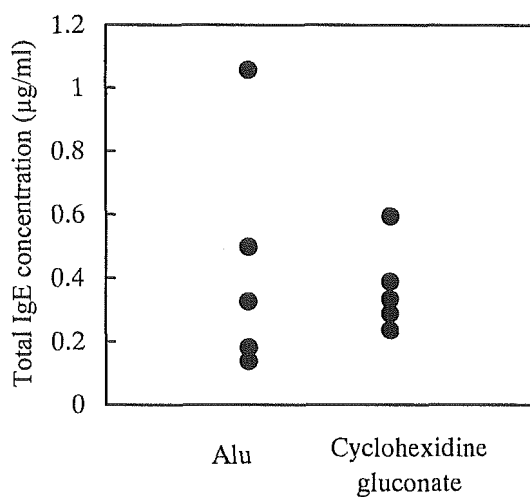


図3. Cyclohexidine gluconate (CHG)投与による血清中総IgE抗体価の変化
Groups of mice (n=5) received 200 µg CHG and Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, blood was corrected and the serum total IgE concentration was measured.

表4. マウスの週齢の違いがOVAによる脾臓重量の変化に及ぼす影響

Group	Animal age	Injection	Body weight (g)	Spleen weight (g)	Spleen/Body×1000
34w-Alum	34 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	24.19 \pm 1.16	0.123 \pm 0.016	5.08 \pm 0.53
34w-OVA	34 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	25.27 \pm 1.00	0.142 \pm 0.013	5.69 \pm 0.73
8w-Alum	8 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	20.17 \pm 1.09	0.115 \pm 0.019	5.70 \pm 0.69
8w-OVA	8 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	20.16 \pm 0.67	0.117 \pm 0.016	5.80 \pm 0.65

Each value represent the mean \pm SD (n = 5).

表5. マウスの週齢差と脾臓リンパ球幼稚者化反応性

Group	Animal age	Injection	³ HTdR incorporation (cpm)				
			Con A	OVA	LPS	PHA	
34w-Alum	34 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	2293 \pm 700	2623 \pm 281	18710 \pm 5150	12058 \pm 2586	17507 \pm 3120
34w-OVA	34 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	1921 \pm 928	7738 \pm 541 **	16101 \pm 8422	11559 \pm 1476	28487 \pm 8649
8w-Alum	8 weeks old	Alum 2 mg / PBS 200 μ l	511 \pm 150	2147 \pm 804	22761 \pm 7172	16401 \pm 3650	19083 \pm 4753
8w-OVA	8 weeks old	OVA 10 μ g + Alum 2 mg / PBS 200 μ l	466 \pm 108	7270 \pm 3818 *	27304 \pm 11392	16089 \pm 3345	25338 \pm 4133

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated 7 days after. Fourteen days after the initial treatment, mice were killed and spleens were collected. Spleen cell suspension was prepared and stimulated with 2 μ g/ml Con A, 1 μ g/ml LPS, 10 μ g/ml PHA or 100 μ g/ml OVA at a final concentration at 37°C for 48 and 72 h. After incubation, the cells were pulsed for 5 h with ³HTdR, and ³HTdR incorporation was measured. Each value represent the mean \pm SD. OVA-treated group showed significant difference as compared to Alum-treated (control) group of the same age (* p < 0.05, ** p < 0.01).

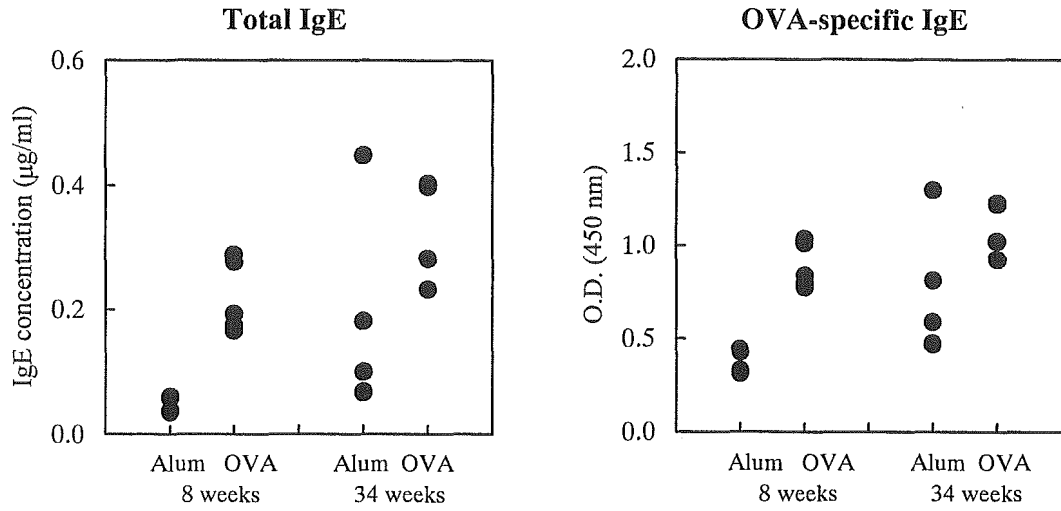


図4. マウスの週齢の違いと血清IgE抗体価の変化

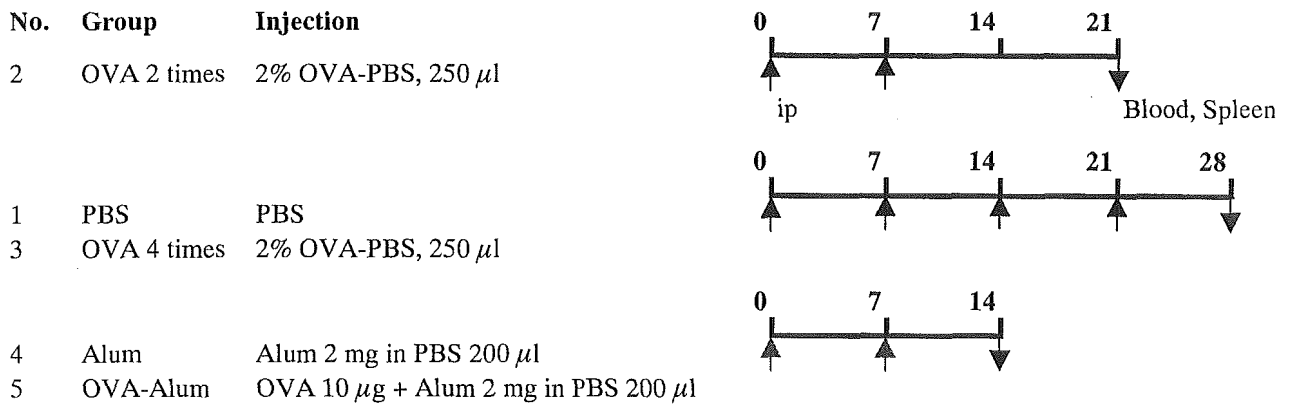


図5. 投与方法の検討(1) アジュバントを用いない方法と従来法の比較

表6. アジュバントを用いず投与回数を増加した場合のサイトカイン産生

No.	Group	IL-4 (pg/ml, mean±SD)	
		Con A-stimulate	OVA-stimulate
1	PBS	24.6 ± 1.7	16.1 ± 0.3
2	OVA 2 times	23.4 ± 1.8	31.7 ± 3.9
3	OVA 4 times	31.1 ± 3.8	54.9 ± 19.8
4	Alum	28.2 ± 3.9	17.2 ± 1.8
5	OVA-Alum	26.1 ± 3.5	56.3 ± 17.1

No.	Group	IFN-γ (pg/ml, Mean±SD)	
		Con A-stimulate	OVA-stimulate
1	PBS	1233 ± 716	396 ± 216
2	OVA 2 times	2588 ± 261	984 ± 463
3	OVA 4 times	1926 ± 416	477 ± 229
4	Alum	991 ± 429	391 ± 137
5	OVA-Alum	882 ± 298	265 ± 120

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated several times at 7 days interval. Seven days after the final treatment, mice were killed and spleen cells were corrected. These cells (5×10^6 cells/1 ml medium) were stimulated with $2 \mu\text{g/ml}$ Con A or $100 \mu\text{g/ml}$ OVA at a final concentration at 37°C for 48 or 72 h. After incubation, the supernatant was collected and the concentrations of IL-4 and IFN- γ were measured. Each value represent the mean \pm SD.

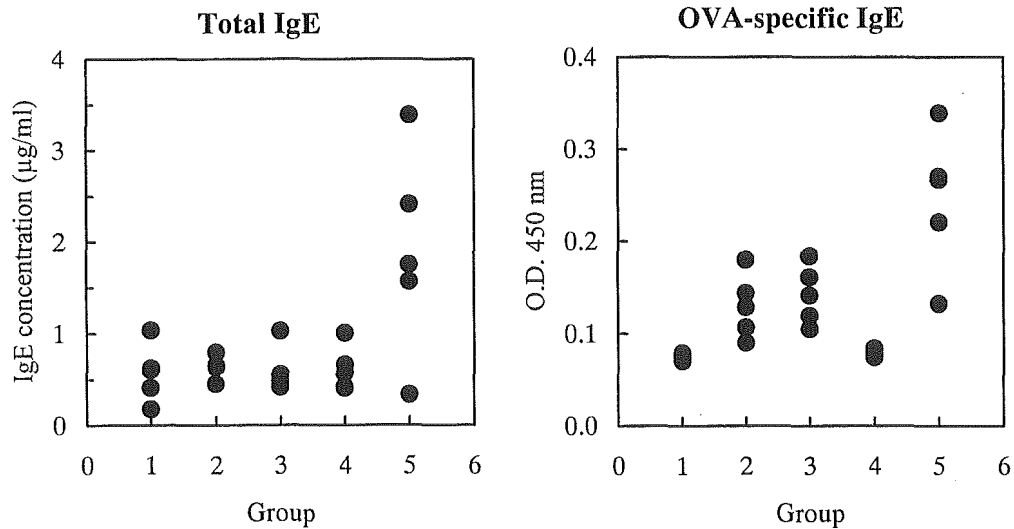


図6. アジュバントを用いずに投与回数を増加した場合の血清IgE抗体価

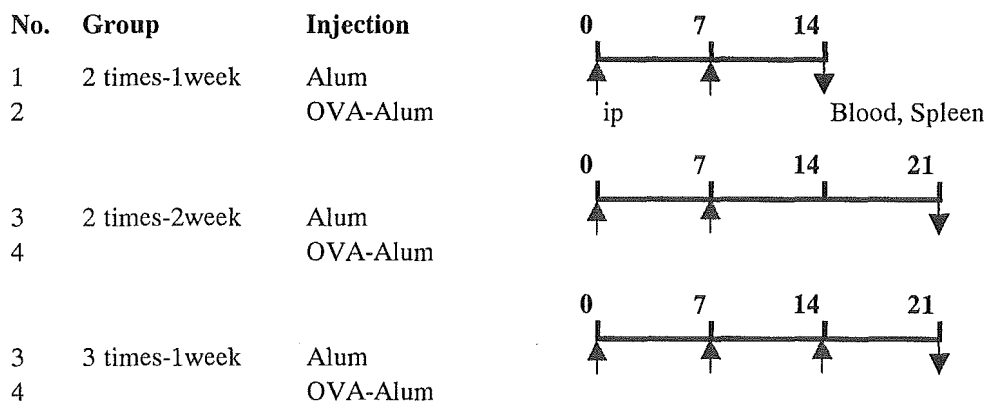
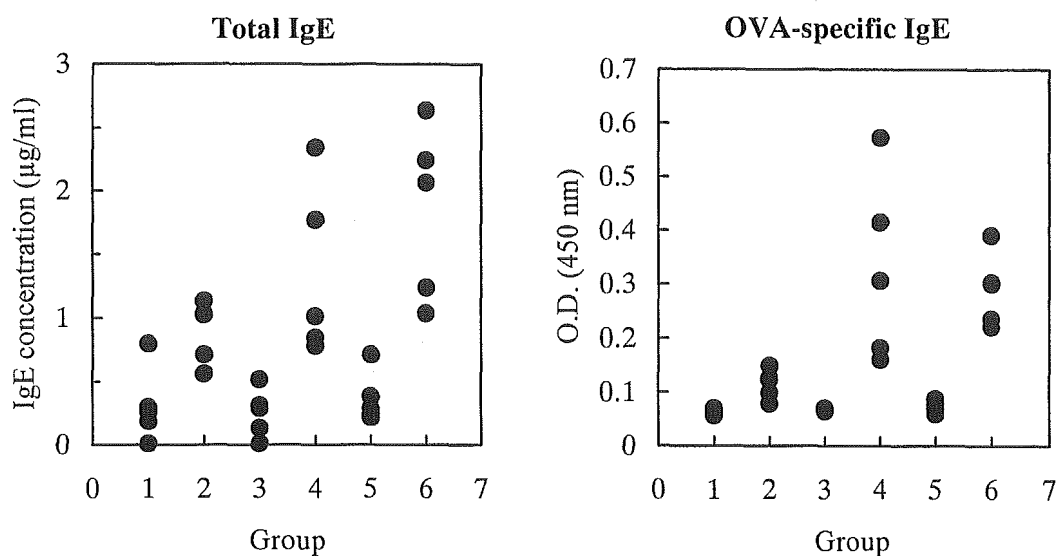


図7. 投与方法の検討(2) アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間の差
 Alum = Alum 2 mg in PBS 200 μ l.
 OVA-Alum = OVA 10 μ g + Alum 2 mg in PBS 200 μ l.

表7. アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間が脾臓重量に及ぼす影響

No.	Group	Treatment			Body weight (g)	Spleen weight (g)	Spleen/Body \times 1000
		Chemical	Number of times	Interval			
1	2 times-1week	Alum	2 times	1 week	20.21 \pm 0.62	0.106 \pm 0.020	5.23 \pm 0.99
2		OVA-Alum	2 times	1 week	19.69 \pm 1.05	0.108 \pm 0.015	5.52 \pm 0.81
3	2 times-2week	Alum	2 times	2 weeks	21.00 \pm 1.01	0.114 \pm 0.009	5.43 \pm 0.22
4		OVA-Alum	2 times	2 weeks	19.67 \pm 0.67	0.112 \pm 0.021	5.69 \pm 0.89
5	3 times-1week	Alum	3 times	1 week	19.96 \pm 0.76	0.117 \pm 0.010	5.84 \pm 0.39
6		OVA-Alum	3 times	1 week	19.48 \pm 1.13	0.120 \pm 0.008	6.19 \pm 0.74

Each value represent the mean \pm SD (n = 5).



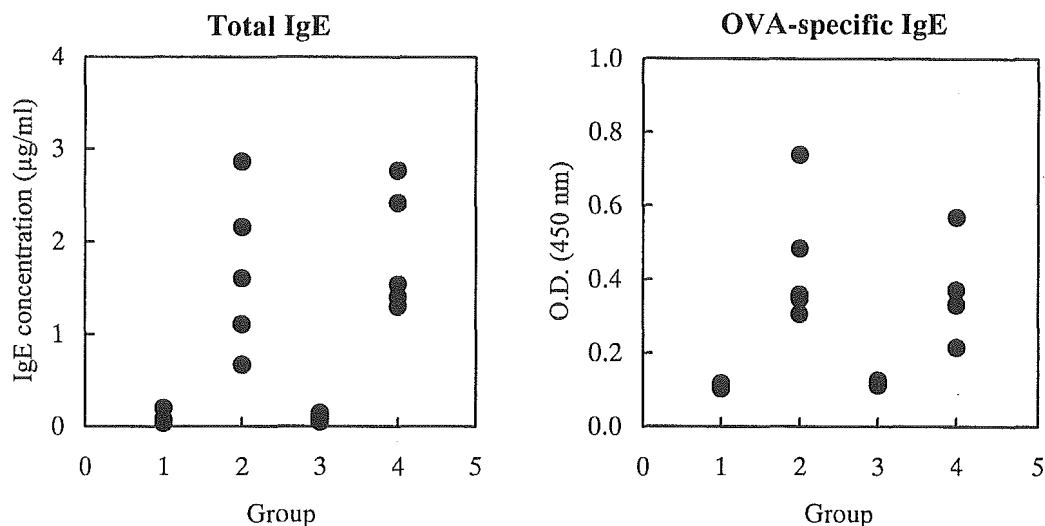
No.	Group	Chemical	Treatment		Total IgE ($\mu\text{g/ml}$)	OVA-specific IgE (O.D. 450 nm)
			Time	Interval		
1	2 times-1week	Alum	2 times	1 week	0.31 ± 0.29	0.063 ± 0.005
2		OVA-Alum	2 times	1 week	0.89 ± 0.24	0.116 ± 0.027
3	2 times-2week	Alum	2 times	2 weeks	0.25 ± 0.19	0.067 ± 0.002
4		OVA-Alum	2 times	2 weeks	1.35 ± 0.68	0.327 ± 0.171
5	3 times-1week	Alum	3 times	1 week	0.37 ± 0.20	0.073 ± 0.011
6		OVA-Alum	3 times	1 week	1.84 ± 0.68	0.291 ± 0.067

図8. アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間が血清IgE抗体価に及ぼす影響

表8. アジュバントを使用した投与での注射回数と解剖までの期間がサイトカイン産生に及ぼす影響

Group	Treatment	Number of		IL-4 ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ ($\mu\text{g/ml}$)	IL-10 ($\mu\text{g/ml}$)
		times	Interval			
No.	Chemical					
1	Alum	2 times	1 week	7.59 ± 1.56	79.25 ± 83.89	17.91 ± 3.82
2	OVA-Alum	2 times	1 week	66.02 ± 24.74	91.71 ± 39.85	200.57 ± 84.15
3	Alum	2 times	2 weeks	3.16 ± 1.26	41.93 ± 27.01	13.25 ± 4.40
4	OVA-Alum	2 times	2 weeks	22.93 ± 12.21	22.85 ± 18.38	82.49 ± 41.61
5	Alum	3 times	1 week	3.71 ± 0.79	36.13 ± 26.09	13.69 ± 4.61
6	OVA-Alum	3 times	1 week	98.50 ± 59.65	31.63 ± 10.63	250.68 ± 132.28

Groups of mice (n=5) received OVA or PBS with or without Alum adjuvant by intraperitoneal injection. Same treatment repeated several times at 7 days interval. One week or two weeks after the final treatment, mice were killed and spleen cells were corrected. These cells (5×10^6 cells/1 ml medium) were stimulated with $100 \mu\text{g/ml}$ OVA at a final concentration at 37°C for 72 h. After incubation, the supernatant was collected and the concentrations of IL-4, IFN- γ and IL-10 were measured. Each value represent the mean \pm SD.



Group No.	Sex	Injection
1	Male	Alum 2 mg
2		OVA 10 µg + Alum 2 mg
3	Female	Alum 2 mg
4		OVA 10 µg + Alum 2 mg

図9. 血清IgE抗体価に及ぼすマウスの性差の影響

表9. OVA投与量の違いによる膝窩リンパ節重量および細胞数の増加率の変化

Amount of OVA (mg)	Stimulation index	
	Lymph node weight	Cell number
0.02	0.80 ± 0.20	1.1 ± 0.6
0.2	1.08 ± 0.47	1.3 ± 0.3
2	1.56 ± 0.52	2.1 ± 0.3

Each value represent the mean ± SD (n = 5).

Weight of popliteal lymph node (PLN) after treatment with saline (control) was 2.23 ± 0.6.

Number of PLN cells of control was 1.81 ± 0.69.

表10. PLNAにおけるcyclohexidine gluconate (CHG)及びovalbumin (OVA)の膝窩リンパ節(PLN)反応

Treatment	Number of animal	Weight of PLN (mg)	Stimulation index	Number of PLN cell (×10 ⁶)	Cellularity index
-	2	2.4 ± 0.6		2.95 ± 0.13	
Saline	2	1.5 ± 0.5		2.11 ± 0.9	
Saline (control)	5	2.1 ± 1.1		2.29 ± 0.89	
CHG 0.2 mg	5	8.2 ± 1.9	4.8 ± 2.4	15.54 ± 2.81	7.4 ± 2.2
Saline (control)	5	2.8 ± 0.9		3.48 ± 1.95	
OVA 2mg	5	4.5 ± 1.3	1.6 ± 0.2	7.95 ± 2.36	3.2 ± 2.7

Stimulation and cellularity index were mean ± SD calculated from the values of the tested vs. control PLN of individual animal.

分担研究報告書

In vitro 発癌リスク評価手法の開発に関する研究

分担研究者 松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所療品部

協力研究者 配島由二 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨：医用材料の in vitro 発癌評価法として、遺伝毒性試験の1つである染色体異常試験の有用性を検討した。4,4'-メチレンジアニリン (MDA) 含有ポリウレタン (PU) シートをモデル陽性対照材料として作成し、その培地抽出液の染色体異常試験を実施した。まず、モデル陽性対照物質 MDA の染色体異常試験の結果、MDA は代謝的活性化系存在下、0.4 mg/ml で染色体の構造異常および数的異常（核内倍加を含む）を誘発した。次にモデル材料の培地抽出液では、4%MDA 含有 PU を高圧蒸気滅菌後試験した結果、代謝的活性化系存在下、疑陽性であった。そこで、MDA 含有 PU の各種抽出物中の MDA および PTMG の溶出量を定量したところ、有機溶媒抽出では比較的高濃度の MDA と共に PTMG が溶出しており、MDA および PTMG の複合効果が示唆された。両物質の同時処理による染色体異常試験の結果、S9 mix 非存在下では主に構造異常が誘発されたが、S9 mix 存在下では核内倍加を含む倍数体の出現が認められた。医用材料の試験においては、溶出されてくる原料のオリゴマーの影響をも考慮する必要性が示唆された。

研究目的

安全かつ有効な医療用具をできるだけ早く患者さんに提供することが望まれるが、その原材料については、添加剤も含め発癌性、免疫原性、エンドトキシンの生体適合性等の安全性評価を行う必要がある。現在「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」の第一次評価のために採用されている試験法のうち発癌性を予測しうる可能性があるものは遺伝毒性試験である。本研究では in vivo 埋植試験と in vitro 遺伝毒性試験を一部併行して実施し、材料の発癌メカニズムの解明と事前予測評価手法の開発を目的として検討を行う。

平成 14 年度は遺伝毒性試験としてガイドラインに採用されている染色体異常試験について、モ

デル陽性対照材料を作成し、試験系の感受性をも含めて検討した。

A. 研究方法

1. 陽性対照物質

4,4'-メチレンジアニリン (MDA, CAS 登録番号 101-77-9 $C_{13}H_{14}N_2=198.27$) は、エポキシ樹脂や軟性ウレタンの硬化剤として用いられており、ポリウレタン (PU) 製造過程の中間物質でもある。その化学構造式を図 1 に示す。

2. 陽性対照材料の作成

PU、0.4%MDA 含有 PU および 4%MDA 含有 PU の 1 mm 厚シートを作製した。

3. 陽性対照材料からの試験用試料の調製

3-1. 材料を滅菌後培地で抽出する方法

滅菌方法

高压蒸気滅菌 121°C、20 分間の高压蒸気滅菌を行った。

EOG 滅菌 EOG 滅菌後十分に脱気した。

材料の培地による抽出

滅菌後、材料を無菌的に約 2 mm×15 mm 大に細切し、材料 0.2 g 当たり 1 ml の培地を添加し、炭酸ガス培養器中で 37°C 48 時間浸漬した。

3-2. 有機溶媒抽出

約 1 g の材料を正確に秤量し、約 2 mm×15 mm 大に細切し、材料 1 g 当たり 3 ml の有機溶媒（メタノール、アセトン）を加えて、室温で 30 分間振盪した。抽出液を回収し、材料に新しい有機溶媒を加えて、同じ条件で振盪した。合計 5 回の抽出を行い、回収した抽出液をドラフト内で揮発させたのち、真空ポンプで完全に溶媒を除去した。抽出物重量を秤量後、最少量の DMSO に溶解した。

4. 染色体異常試験

4-1. 細胞 チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL）を用いた。倍加時間は約 13～15 時間である。

4-2. 培養液 Minimum Essential Medium (GIBCO 11095-080) に 56°C 30 分間非働化した牛胎児血清を 10% 添加したものをを用いた。

4-3. S9 mix

試験物質の代謝的活性化を行うため、キッコーマン社（千葉県野田市）製の「染色体異常試験用凍結 S-9 Mix」を購入し、使用直前に冷水中で解凍して用いた。S9 は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンを投与した Sprague Dawley ラ

ットの肝臓から調製されている。

4-4. 処理方法

1.5×10^5 / 5 ml / plate の細胞を播種し、翌日 S9 mix 存在下および非存在下、培地抽出液または有機溶媒抽出物で 6 時間処理した。培地抽出液での処理時には、細胞を培養していた培地を除き、培地抽出液 2.5 ml および S9 mix（または培地）0.5 ml を添加した。有機溶媒抽出物での処理時には、S9 mix 添加群では、細胞を培養していた培地を 2.5 ml 除き、S9 mix 0.5 ml を加え、また、S9 mix 非添加群では、細胞を培養していた培地を 2 ml 除き、そこへ、両処理群とも 15 μ l の DMSO または抽出物の DMSO 溶液を添加した。6 時間後、処理液を新鮮な培地と交換し、さらに 18 時間培養後、染色体標本作製した。

4-5. 染色体標本作製

標本作製 2 時間前に、分裂中期像を蓄積する目的でコルセミド (GIBCO 15210-040、最終濃度 0.2 μ g/ml) を添加した。トリプシンで細胞を回収し、0.075 M KCl 溶液で 37°C、15 分間の低張処理を行った。固定液（氷酢酸：メタノール = 1:3 の混合液）で 3 回固定を行い、適切な濃度の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を脱脂洗浄済みスライドグラスに滴下し、空気乾燥させた。翌日、作製した標本をギムザ溶液で染色した。

4-6. 染色体異常の観察

光学顕微鏡（400 倍）で良く広がった分裂中期像 100 個について、染色体の構造異常および倍数体の観察を行った。分類した構造異常名およびその略号をその模式図と共に図 2 に示す。判定はこれまでの陰性対照群の背景データ¹より、原則として異常頻度が 4% までを陰性、5% から 9% までを疑陽性、10% 以上を陽性とした。

5. 抽出液および抽出物中の MDA および PTMG の

分析、定量

EOG 滅菌後の培地抽出液および有機溶媒抽出物について、MDA および PTMG オリゴマーの分析・定量を行った。以下に用いた機器および分析条件を示す。

5.-1. 分析装置

HPLC : Agilent 1100 Series

カラム CAPCELL PAK C8 UG120 (5 μ m, 2 x 150 mm, Shiseido)

カラム温度 40°C

溶媒流速 0.2 ml/min

サンプル注入量 5 μ l

MS : JEOL AccuTOF JMS-T100LC

イオン化モード ESI-positive

イオンガイドピーク間電圧 1800 V

イオンガイドバイアス電圧 30 V

フォーカス電圧 -102 V

集束レンズ電圧 10 V

四重極レンズ電圧 20 V

左右レンズ電圧 -2 V

上下レンズ電圧 1 V

押し出しバイアス電圧 -0.42 V

リフレクトロン電圧 850 V

押し出し電圧 778 V

引き込み電圧 -778 V

飛行管電圧 -7000 V

ニードル電圧 2000 V

オリフィス1 電圧 85 V

オリフィス2 電圧 5 V

リングレンズ電圧 10 V

脱溶媒室温度 250°C

オリフィス1 温度 80°C

データ処理 : MAY 2000 & Excel

5.-2. MDA 分析

有機溶媒抽出物

1) 有機溶媒抽出物をメタノールに溶解 (最終濃度 1-10 mg/ml)

2) メタノールで希釈

3) 上記希釈液に等量の 3,4'-diaminodiphenyl ether (20 ppm) を添加

4) LC-MS 分析 :

HPLC 溶媒 A 液 = 水、B 液 = MeOH

グラジエント条件 : 25% B / 0-11 min

25→95% B / 11-12 min

95% B / 12-21 min

95→25% B / 21-22 min

25% B / 22-25 min

検量線は MDA 0.05-10 ppm の範囲で作製した。

定量計算は MDA m/z 199.132、

IS (3,4'-diaminodiphenyl ether) m/z 201.119 を使用した。

培地抽出物

1) Medium (3.75-4.0 ml) に 200 μ l の 2M NaOH を添加

2) ジエチルエーテルで 3 回抽出

3) ジエチルエーテル層を N₂ 乾燥

4) MeOH/THF (1:1) に溶解

5) フラッシュした Sep-Pak C18 カートリッジを通過

6) MeOH/THF (1:1) 20 ml で洗浄

7) 通過液と洗浄液を集めエバポレーターで乾固

8) IS 10 ppm 溶液 1 ml に溶解

9) フィルター濾過し LC-MS 分析

培地抽出物 からの MDA 回収率は 4 ml の培地に MDA 20 μ g をスパイクした後、上記と同じ方法により実施した。

5.-3. PTMG 分析

有機溶媒抽出物

1) 有機溶媒抽出物をメタノールに溶解 (最終濃度 1-10 mg/ml)

- 2) メタノールで希釈 (最終濃度 Table 参照)
- 3) 上記希釈液に等量の 3,4'-diaminodiphenyl ether (20 ppm) を添加
- 4) LC-MS 分析:
HPLC 溶媒 A 液 = 水、B 液 = MeOH/THF (1:1)

グラジエント条件: 40→95% B / 0-30 min
95% B / 30-35 min
95→40% B / 35-36 min
95% B / 36-40 min

検量線は作製せず、PTMG1000 に含まれる各種ポリマー成分のピーク面積から存在比率を求め、IS (3,4'-diaminodiphenyl ether) ピークとの MS 的検出感度の補正係数 (ファクター) を乗じて定量した。

培地抽出物からの抽出法は MDA と同じで、スパイク実験では MDA の代わりに PTMG1000 (20 μ g) を添加し、m/z 977 のポリマー成分を指標として計算した。

C. 研究結果

陽性対照物質 MDA の染色体異常試験結果

表 1 に示すように、MDA は S9 mix 非存在下では陰性であったが、S9 mix 存在下、0.4 mg/ml で染色体の構造異常 (ctg, ctb, cte 等)、数的異常 (Poly, 倍数体) を誘発し、特徴的なことは倍数体の中でも核内倍加と呼ばれる形態が観察されたことである。実際に MDA 処理後 CHL 細胞で観察された染色体異常の顕微鏡写真を図 3 に示す。倍数体および核内倍加とも染色体の数的異常に分類されるが、倍数体では染色体が散在しているのに対し、核内倍加では 2 倍になった染色体が対を形成している。

培地抽出液の染色体異常試験結果

表 2 に 4%MDA 含有 PU の高圧蒸気滅菌処理後培地抽出液の結果を示す。S9 mix 存在下抽出液

100% で処理した場合は、頻度は陽性対照物質の MDA よりも低かったが、核内倍加と構造異常を誘発した。そこで抽出物中に実際に MDA がどの程度溶出されてきているのかを測定した。また、原料の PTMG 等の溶出の可能性もあるので、同時に測定した。

抽出物および抽出液中の MDA および PTMG の分析

結果を表 3 に示す。MDA は、培地抽出液では、有機溶媒抽出の約 20% (0.4%MDA 含有 PU の場合) および 6% (4%MDA 含有 PU の場合) しか抽出されなかった。MDA の溶出量は材料の MDA 含有量と相関していた。また、PU 自体からも有機溶媒抽出では微量ではあるが MDA が検出された。ソフトセグメントの PTMG は有機溶媒抽出では MDA と同程度またはそれ以上の高用量抽出された。溶出量は材料の MDA 含有量が高い程多くなっているが、その理由は不明である。これに対して、培地抽出では有機溶媒抽出の約 0.1% しか抽出されなかった。

そこで、MDA と PTMG の染色体異常誘発性及ばす影響を検討した。その結果、表 4 に示すように、S9 mix 非存在下では PTMG 単独では構造異常の誘発は認められなかったが、0.4 mg/ml MDA 共存下では、PTMG の濃度依存的に染色体異常頻度が上昇した。また、S9 mix 存在下では、PTMG も単独 (0.2, 0.4 mg/ml) で核内倍加を含む染色体の数的異常を誘発するが構造異常は誘発しないことが判明した。MDA 共存下では、MDA 単独よりも高頻度の数的異常が PTMG 0.05 および 0.1 mg/ml で誘発され、この濃度では、PTMG は単独では異常を誘発しないため、MDA と PTMG との複合作用であることが考えられた。

D. 考察および結論

本研究で用いたモデル陽性対照物質 MDA は、CHL 細胞で再現性よく核内倍加を誘発し、これは

稀な事象であることから、陽性物質として良い指標になると考えられたが、陽性反応を示す濃度域が狭いという欠点も判明した。

モデル陽性対照材料を用いた試験では、予想されたことではあるが、抽出法の違いによって、MDA の溶出量は表 3 のように異なり、培地抽出では、添加した MDA も約 2-5%しか回収できなかったが、有機溶媒抽出では約 27-35%回収することができた。また、PU の原料の一つである PTMG についても、培地抽出と有機溶媒抽出では大きく異なり、前者は後者の約 0.5%しか回収できなかった。ちなみに、PU のメタノール抽出において抽出物総量よりも多い PTMG 溶出量が表示されているが、これは分析法の誤差範囲内と考えている。

PU ソフトセグメントの PTMG の溶出量が予想以上に多いことが判明し、それに伴って実施した染色体異常試験において PTMG も単独で S9 mix 存在下、染色体の数的異常（核内倍加を含む）を誘発することが明らかとなった。また、MDA との同時処理から、S9 mix 非存在下での染色体構造異常誘発という複合作用も明らかとなった。医用材料の生物学的試験を実施する場合には、製品に添加された化学物質以外に、原料からの溶出物も試験結果に影響を及ぼす可能性が強く示唆されていると考えられる。

高圧蒸気滅菌や放射線では、PU からの MDA およびその他の成分の溶出^{2,3}が報告されているが、本研究の分析データより、PU の有機溶媒抽出においても MDA が溶出していることが判明した。抽出溶媒によって抽出物の溶出量は異なり、医用材料の試験を行うにあたっては、抽出溶媒の選択を慎重に行うことが必要であると考えられる。

E. 研究発表

松岡厚子、土屋利江 医療用具の生物学的試験の標準化に関する研究；医療材料の染色体異常試験
第 24 回日本バイオマテリアル学会大会

2002.11.30 東京早稲田

F. 参照論文

1. 染色体異常試験データ集改訂 1998 年版、祖父尼俊雄監修、L.I.C.東京、1998
2. Shintani, H. and A. Nakamura (1989) Analysis of a carcinogen, 4,4'-methylenedianiline, from thermosetting polyurethane during sterilization, *J. Anal. Toxicol.*, 13, 354-357.
3. Shintani, H. (1995) The relative safety of gamma-ray, autoclave, and ethylene oxide gas sterilization of thermosetting polyurethane, *Biomedical Instrumentation and Technology*, 513-519.

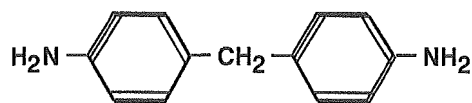


図1 4,4'-メチレンジアニン (MDA) の構造式

表1 陽性対照物質MDAの染色体異常試験結果

S9	濃度 (mg/ml)	倍数体	染色体構造異常の頻度 (%)							判定
			c tg	c tb	c te	f	csb	cse	total	
—	0 (DMSO)	0	1	1	0	0	0	0	2	
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	0.2	0	4	1	0	0	1	0	6	±
	0.4	1	1	1	0	0	0	1	3	—
	0.8								Tox	
+	0 (DMSO)	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.1	0	1	0	0	0	0	1	2	—
	0.2	1	1	1	0	0	1	0	3	—
	0.4	8 (3)	4	2	9	0	0	0	14	+
	0.8								Tox	

倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。

表2 4%MDA/PU高圧蒸気滅菌後培地抽出液

S9	濃度 (%)	倍数体	染色体構造異常の頻度 (%)							判定
			c tg	c tb	c te	f	csb	cse	total	
—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12.5	0	1	0	0	0	0	0	1	—
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	100	6	1	0	1	0	1	0	3	±P
+	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
	12.5	0	1	1	0	0	0	0	2	—
	25	2 (1)	0	0	1	0	0	1	2	—
	50	1	0	0	0	0	0	0	0	—
	100	1 (1)	1	0	8	0	0	0	9	±

倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。
判定の項のPは、倍数体の結果を表示していることを示す。

表3 抽出液(物)中のMDA,PTMGの定量

試料	材料重量 (g)	抽出物量 (mg)	抽出液量 (ml)	MDA溶出量 (mg/g材料)	PTMG溶出量 (mg/g材料)
EOG 滅菌後培地抽出液					
PU	6.2285		31.142	N.D.	0.0125
0.4%MDA含有PU	3.0864		15.43	0.24	0.0178
4%MDA含有PU	3.1975		15.985	0.902	0.0111
メタノール抽出物					
PU	0.8709	2.1		0.00024	2.6
0.4%MDA含有PU	0.9972	6.3		1.08	5.2
4%MDA含有PU	0.862	34.9		13.7	16.9
アセトン抽出物					
PU	0.92	22.8		0.00035	5.6
0.4%MDA含有PU	0.9628	25.3		1.28	7.7
4%MDA含有PU	0.8376	53.5		14.2	10.0

N.D., 検出限界以下

表4 MDAとPTMG-1000の複合効果

S9	MDA (mg/ml)	PTMG-1000 (mg/ml)	倍数体	染色体構造異常の頻度(%)							判定
				cig	ctb	cte	f	csb	cse	total	
—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0.05	2	0	0	0	0	0	0	0	—
	0	0.1	1	0	0	0	0	0	0	0	—
	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	0	0.4	0	0	0	1	0	0	0	1	—
	0.4	0	1(1)	1	0	0	0	0	0	1	—
	0.4	0.05	0	2	2	3	0	0	0	7	±
	0.4	0.1	0	2	7	11	0	0	0	18	+
	0.4	0.2								Tox	
	0.4	0.4								Tox	
+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
	0	0.05	3	2	0	0	0	0	0	2	—
	0	0.1	2	1	1	0	0	0	0	2	—
	0	0.2	12(7)	1	0	0	0	0	0	1	+P
	0	0.4	9(3)	1	0	0	0	0	0	1	±P
	0.4	0	2(1)	1	0	2	0	0	0	3	—
	0.4	0.05	7(7)	1	1	2	0	0	0	4	±P
	0.4	0.1	8(4)	1	4	10	0	0	0	14	+
	0.4	0.2								Tox	
	0.4	0.4								Tox	

→ Tox:細胞死、倍数体の項の括弧内の数字は核内倍加の数を示している。

染色分体型ギャップ

(c t g)



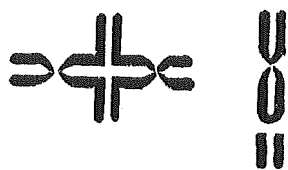
染色分体型切断

(c t b)



染色分体型交換

(c t e)



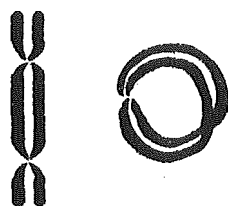
染色体型切断

(c s b)



染色体型交換

(c s e)



断片化

(f r g)

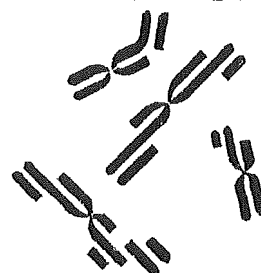
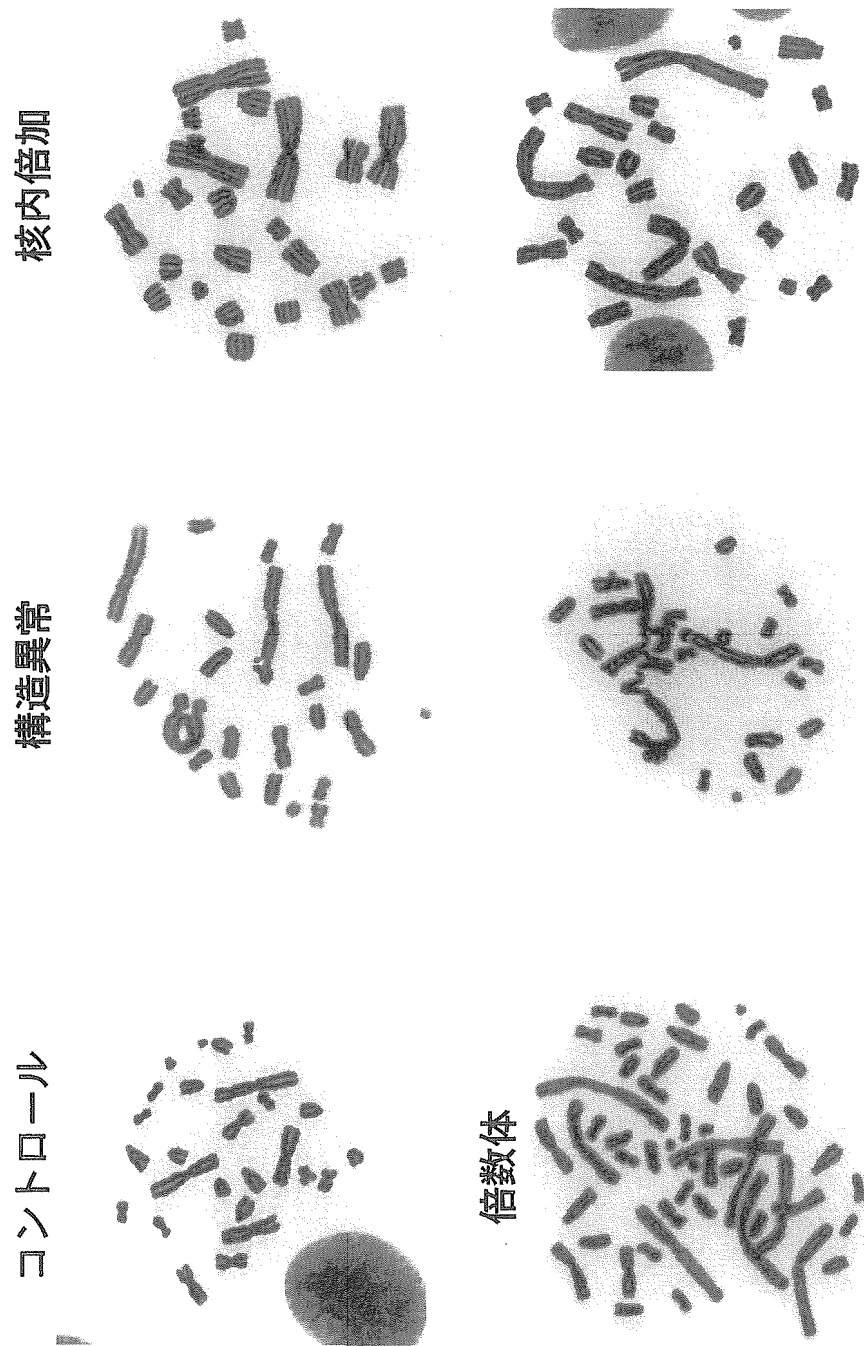


図 2. 染色体異常の模式図

図3 MDA処理後CHL細胞で観察された染色体異常



4,4'-ジアミノジフェニルメタン添加ポリウレタンならびにポリ乳酸化粒子の
癌原性評価に関する研究

分担研究者 井上 博之 （財）食品農医薬品安全性評価センター

新規材料の化学的性質に起因する発癌の可能性が危惧されており、形状に起因する異物発癌なのか化学発癌なのか区別可能な発癌試験を開発する必要性が生じてきた。この研究では社会的ニーズの高い材料の発癌性リスク評価手法を進展させるため、変異原性のある添加剤として知られる4,4'-ジアミノジフェニルメタン（MDA）を含有するポリウレタンフィルムならびにポリ乳酸化粒子（PLLA）をラットに皮下埋植し発生する腫瘍の発生率を検索し化学発癌か異物発癌かを特定する。

A. 研究目的

新規材料の化学的性質に起因する発癌の可能性が危惧されるため、形状に起因する異物発癌なのか化学発癌なのか区別可能な発癌試験を開発する必要がある。変異原性のある添加剤含有材料の臨床への影響を評価する手法を明らかにする。

B. 研究方法

生後4週 of Wistar[SPF]雄ラットを220匹購入し、14日間馴化後30匹ずつ6群に分け、ポリウレタンフィルム（PU）、0.4%MDA添加PU、4%MDA添加PU、PLLA0.4g、PLLA2gの5種類の材料をそれぞれラット背部皮下に埋植し、対照群には手術処置のみ行い、術後の経過を見るとともに2年間の飼育観察を行う。その間に定期的に体重測定、腫瘍の触診を行う。また、観察期間終了時には血液学検査、血液生化学検査、病理組織学検査を実施する。高濃度MDA添加ならびにPLLA高用量埋植による発癌活性の変化を確認する。（倫理面への配慮）

ラットに対し埋植処置を行い、長期に飼育を行うため、動物実験倫理規定に配慮する。

C. 試験結果

埋植後60週間が経過した。PLLA群では、2g群の5例が、埋植後1および2週に大量の異物投与に起因すると考えられるショック症状を示したため、いずれも切迫解剖した。また埋植後1週からPLLA群のほぼ全例で埋植部位に流動性物質の貯留が観察された。この流動性物質量は埋植量に依存しており、流動性物質貯留は0.4g群で埋植後6週、2g群で埋植後8週までに消失した。2g群では、埋植後8週から体重増加抑制が認められるとともに、埋植後18週から触診により埋植部位の皮下に腫瘍が認められ、埋植後42週には10例まで増加した。同群では、埋植後50週から埋植後60週までに5例を死後解剖または切迫解剖した。解剖では、埋植部位に腫瘍が認められた。

PU群では、埋植後55週に1例を切迫解剖し、埋植部位に腫瘍が認められた。

その他、対照群で2例、PU群で1例を切迫解剖したが、いずれも埋植部位以外に腫瘍が観察された。

各群の埋植後60週までの皮下の腫瘍の発生数は、対照群0例、PU群2例、PU+0.4%MDA群1例、PU+4%MDA群2例、PLLA0.4g群1例、PLLA2g群10例であった。

D. 考察