

図 3-3-1 試験前 MPC 処理 CL-PE の  $C_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

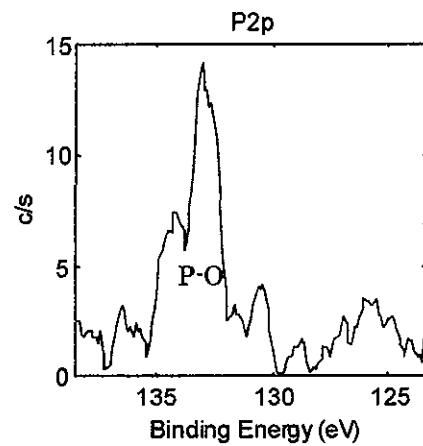


図 3-3-4 試験前 MPC 処理 CL-PE の  $P_{2p}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

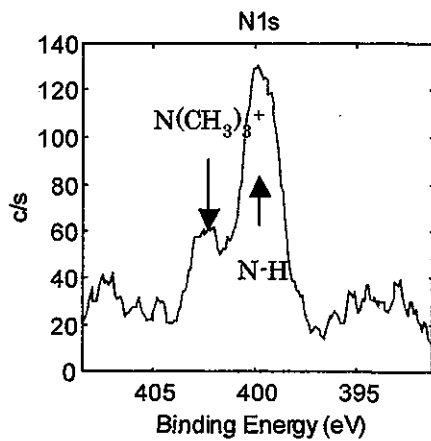


図 3-3-2 試験前 MPC 処理 CL-PE の  $N_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

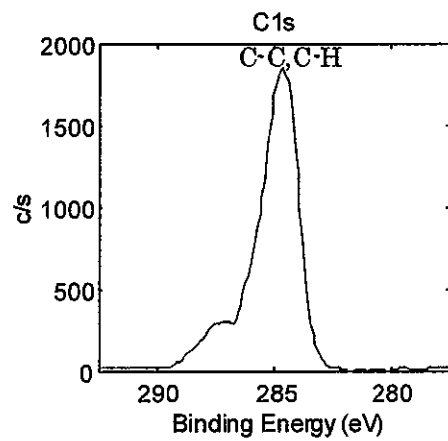


図 4-1-1 試験後 MPC 処理 CL-PE の  $C_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $90^\circ$ )

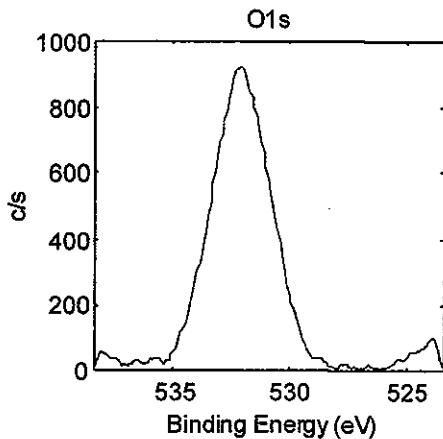


図 3-3-3 試験前 MPC 処理 CL-PE の  $O_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

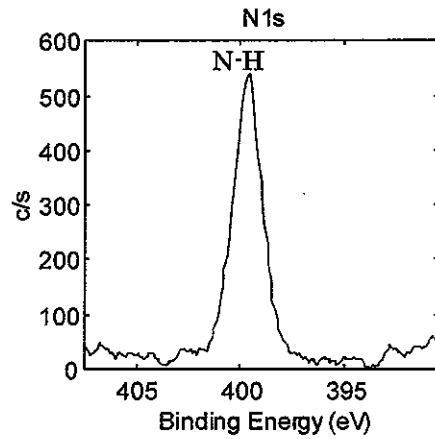


図 4-1-2 試験後 MPC 処理 CL-PE の  $N_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $90^\circ$ )

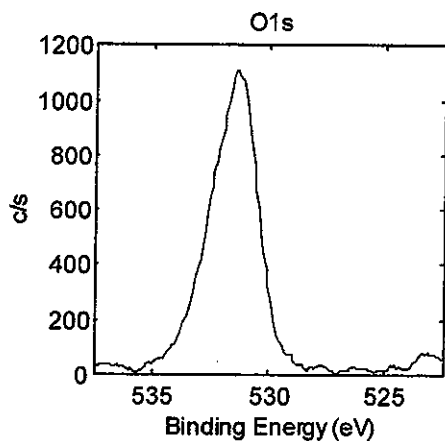


図 4-1-3 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $O_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $90^\circ$ )

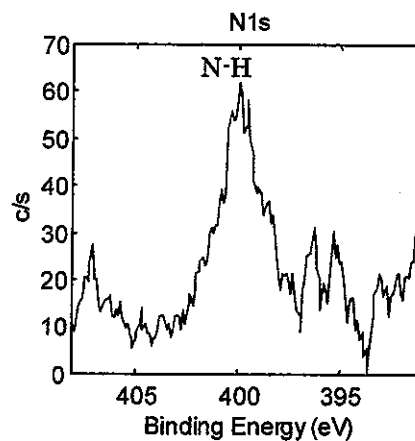


図 4-2-2 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $N_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $45^\circ$ )

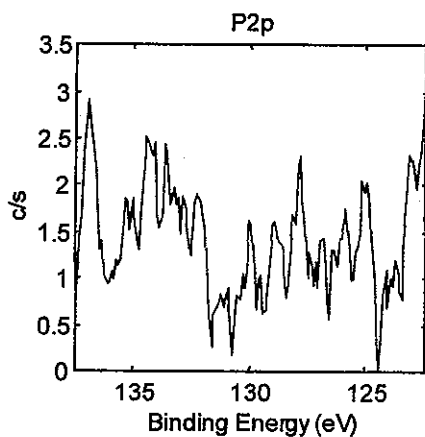


図 4-1-4 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $P_{2p}$  光電子スペクトル (観察部位:  $90^\circ$ )

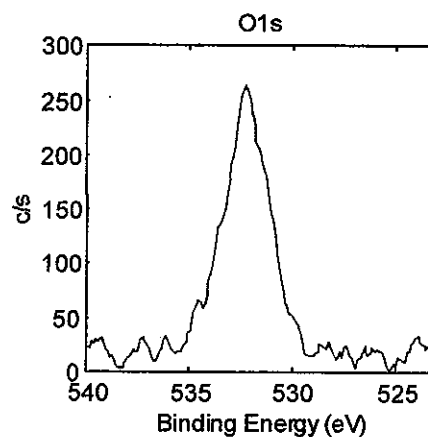


図 4-2-3 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $O_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $45^\circ$ )

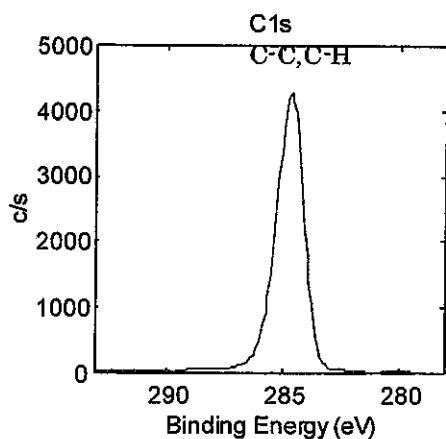


図 4-2-1 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $C_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $45^\circ$ )

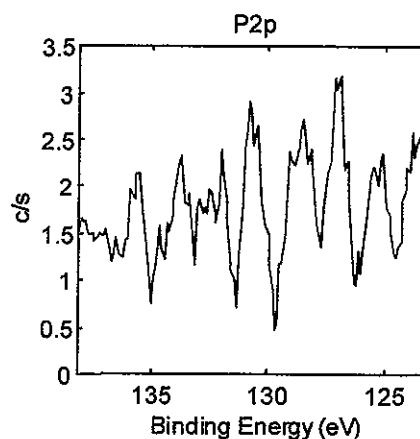


図 4-2-4 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $P_{2p}$  光電子スペクトル (観察部位:  $45^\circ$ )

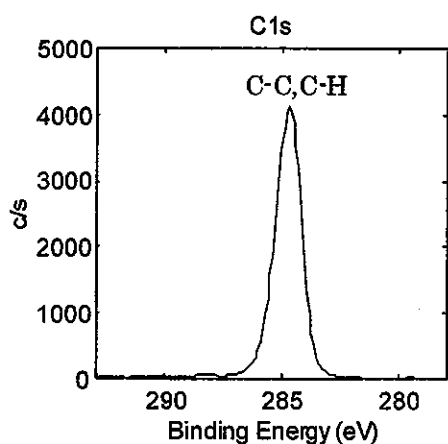


図 4-3-1 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $C_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

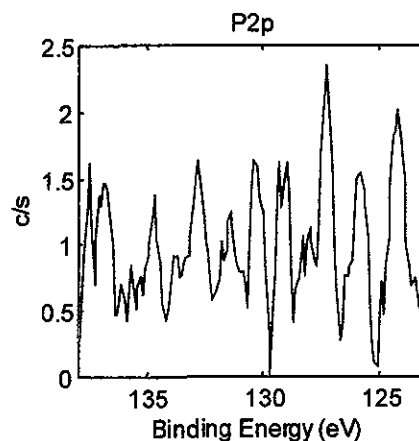


図 4-3-4 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $P_{2p}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

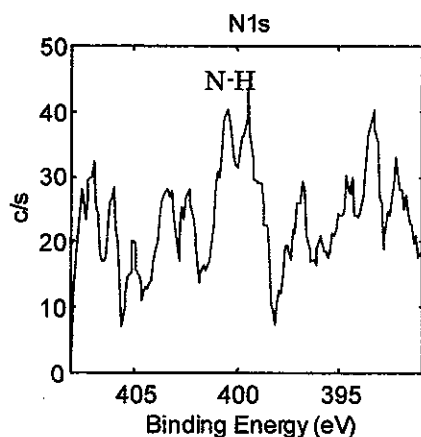


図 4-3-2 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $N_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

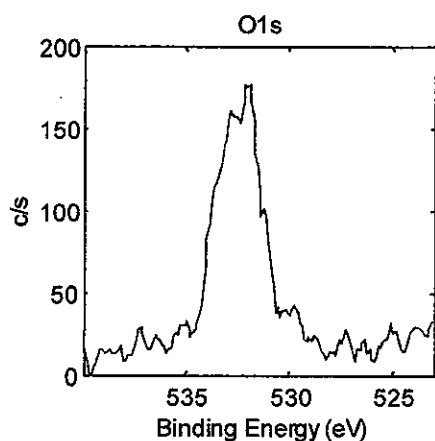


図 4-3-3 試験後 MPC 処理 CL\_PE の  $O_{1s}$  光電子スペクトル (観察部位:  $0^\circ$ )

#### 摩耗試験前の MPC ポリマー処理

CL\_PE ライナーより、MPC ポリマー由来の N 元素を持つ  $N(CH_3)^+$  結合エネルギーおよび N-H 結合エネルギー、元素 O を持つ P-O 結合エネルギーを示すピークが検出された。これらにより、MPC ポリマー処理は正確に行われたと判断できる。一方、摩耗試験 (1000 万回) 後の MPC ポリマー処理 CL\_PE ライナーでは、P 元素由来の結合エネルギーを示すピークは認められなかった。しかし、N 元素由来の N-H 結合エネルギーを示すピークが検出された。

#### D. 考察

摩耗試験 1000 万回後の MPC ポリマー処理 CL\_PE ライナーの表面において、MPC 由来の N 元素を持つ N-H 結合エネルギーピークが観察された。1000 万回におよぶ長期摩耗試験後においても、MPC ポリマー処理層は残存していることが示唆された。但し、天頂部 ( $0^\circ$  部) においては、N-H 結合エネルギーの光電子強度の低下が認められた。つまり、天頂部の MPC ポリマー処理層量は減少した可能性も考えられ、さらなる検討が必要である。

今後はさらに歩行負荷を加え、実用

化に向けた検討を行うことになるが、リンを呈色するオスミウム染色と電界放射型透過電子顕微鏡 (Field Emission Transmission Electron Microscope: FE-TEM) による観察を併用した手法を用い、ナノオーダーの表面処理を同定する試みを開始している。さらに処理効果の定量的な同定方法、製品化された場合の非侵襲的な処理効果同定方法を開発する必要があると考える。

#### E. 結論

1000 万回の摩耗試験後において、MPC ポリマー処理 CL\_PE ライナー表面には、MPC 由来の N 元素を持つ結合エネルギーを示すピークが確認された。従って、長期摩耗試験後においても、MPC 処理層は残存していることが示唆された。

MPC ポリマーによる人工関節摺動面のナノ表面処理は、長期にわたり人工関節の弛みを阻止する画期的な新技術として、期待することができる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Daisuke Miyamoto, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Effect of Water-soluble Phospholipid Polymers Conjugated with Papain on the Enzymatic Stability. *Biomaterials* 25(1) 71-76 (2004)
2. Kazuhiko Ishihara, Daisuke Nishiuchi, Junji Watanabe, and Yasuhiko Iwasaki: Polyethylene/phospholipid Polymer Alloy as Alternative to Poly (vinyl chloride)-based Materials. *Biomaterials* 25(4) 1115-1122 (2004)
3. Daisuke Miyamoto, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Highly-stabilized Papain Conjugated with Water-soluble Phospholipid Polymer Chain Having a Reacting Terminal Group. *J.Appl.Polym.Sci.* 91 827-832 (2004)
4. Kumiko Sakai-Kato, Masaru Kato, Kazuhiko Ishihara, Toshimasa Toyo: An Enzyme Immobilization Method for Integration of Biofunctions on a Microchip Using a Water-soluble Amphiphilic Phospholipid Polymer Having a Reacting Group. *Lab on a Chip* 4 4-6 (2004)
5. Tomohiro Konno, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Conjugation of Enzymes on Polymer Nanoparticles Covered with Phosphorylcholine Groups. *Biomacromolecules* 5 342-347 (2004)
6. Ryo Ogawa, Junji Watanabe, Kazuhiko Ishihara: Segmented Polyurethane / 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Nano-Ordered Surface Morphology for Biomedical Applications. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn* 29(1) 177-180 (2004)
7. Yuuki Inoue, Junji Watanabe, Madoka Takai, and Kazuhiko

- Ishihara: Regulation of Nano-surface Properties by Finely Synthesized Fluorinated Phosphorylcholine Polymers. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn* 29(1) 181-184 (2004)
8. Junji Watanabe and Kazuhiko Ishihara: Water Intrusion Property on Novel Porous Matrix Composed of Bioinspired Polymer Stereocomplex. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn* 29 (1) 185-188 (2004)
  9. Jongwon Park, Shigeru Kurosawa, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Evaluation of Novel 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC) Polymeric Nanoparticles for Immunoassay of C-reactive Protein Detection. *Anal. Chem.* 76(9) 2649-2655 (2004)
  10. Nobuyuki Morimoto, Akihiko Watanabe, Yasuhiko Iwasaki, Kazunori Iwasaki, and Kazuhiko Ishihara: Nano-scale Surface Modification of Segmented Polyurethane with a Biocompatible Phospholipid Polymer. *Biomaterials* 25(23) 5353-5391 (2004)
  11. Keigo Takei, Tomohiro Konno, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Regulation of Enzyme-substrate Complexation with a Phospholipid Polymer. *Biomacromolecules* 5(3) 858-862 (2004)
  12. Yasuhiko Iwasaki, Chigusa Nakagawa, Michiko Ohtomi, Kazuhiko Ishihara, Kazunori Akiyoshi: Novel Biodegradable and Biocompatible Phosphorylcholine Polymer Hydrogels Cross-linked with a Methacryloyl Functionalized Polyphosphate. *Biomacromolecules* 5(3) 1110-1115 (2004)
  13. Yuuki Inoue, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Dynamic Motion of Phosphorylcholine Groups at the Surface of Poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-random-2,2,2-trifluoroethyl methacrylate). *J. Colloid Interface Sci.* 274(2) 465-471 (2004)
  14. Mizuna Kimura, Kikuko Fukumoto, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Hydrogen Bonding Driven Spontaneous Gelation of Water-soluble Phospholipid Polymers in Aqueous Medium. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn* 15(5) 631-644 (2004)
  15. Sang Ho Ye, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: Cellulose Acetate Hollow Fiber Membranes Blended with Phospholipids Polymer and Their Performance for Hemopurification. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn* 15(8) 981-1001 (2004)
  16. Yuuki Inoue, Junji Watanabe, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara: Surface Characteristics of Block-type Copolymer Composed of Semi-fluorinated and

- Phospholipid Segments Synthesized by Living Radical Polymerization. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn* 15(9) 1153-1166 (2004)
17. Yoshihiro Kyritoshi and Kazuhiko Ishihara: Synthesis of Dimethacrylate Having Phosphorylcholine-like Linkage as a Hydrophilic Cross-linker for Making Hydrogel. *Polymer* 45 749-7504 (2004)
18. Youichi Shindo, Masaya Kozaki, Kikuko Fukumoto, and Kazuhiko Ishihara: Properties of Blend Polymers Composed of Phospholipid Polymer and Photocrosslinkable PVA. *J. Photopolymer Sci. Technol.* 17 75-76 (2004)
19. Daisuke Miyamoto, Junji Watanabe, Kazuhiko Ishihara: Effects of Bioconjugation with Novel Phospholipid Polymers on Enzymatic Activity and Stability. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn* 29(6) 2863-2866 (2004)
20. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Tomiharu Matsushita, Ung-il Chung, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Surface Grafting of Artificial Joints with a Biocompatible Polymer for Preventing Periprosthetic Osteolysis. *Nature Materials* 3(11) 829-836 (2004)
21. Kwangwoo Nam, Junji Watanabe, and Kazuhiko Ishihara: The Characteristics of Spontaneously Forming Physically Cross-linked Hydrogel Composed of Two Water-soluble Phospholipid Polymers for Oral Drug Delivery Carrier I: Hydrogel Dissolution and Insulin Release under Neutral pH Condition. *Eur. J. Pharm.* 23(3) 261-270 (2004)
22. 石原一彦: 細胞膜に着目した体に適合しやすい材料ーリン脂質ポリマーバイオマテリアル。現代化学 8 49-54 (2004)
23. Tomohiro Konno, Hirokazu Hasuda, Kazuhiko Ishihara, and Yoshihiro Ito: Photo-immobilization of a Phospholipid Polymer for Surface Modification. *Biomaterials* 26(12) 1381-1388 (2005)
24. Yasuhiko Iwasaki and Kazuhiko Ishihara: Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications. *Anal Bioanal Chem* 381 534-546 (2005).
25. Tomomi Ito, Yasuhiko Iwasaki, Tadashi Narita, Kazunari Akiyoshi, and Kazuhiko Ishihara: Cell Separation in Microchannel Coated with Electrically Charged Phospholipid Polymers. *Colloid and Surfaces, B: Biointerfaces* 41 175-180 (2005)
26. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩、石原一彦: 新素材による人工股関節の開発。整・災外 48 245-250 (2005)
- 2.学会発表

1. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Improved longevity of the artificial joints by grafting of biocompatible phospholipid polymer on the polyethylene liner. 7<sup>th</sup> World Biomaterial Congress. 2004.5.17-21 (Sydney, Australia)
2. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーのナノ表面処理による関節摺動面の人工関節の弛緩防止効果—長寿命型人工関節の開発—. 第2回PCサーフェイステクノロジー研究会. 2004.7.23 (東京ドームホテル、東京)
3. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、鄭雄一、中村耕三、川口浩: MPC ポリマーのナノ表面処理による人工関節の弛緩防止効果—長寿命型人工関節の開発—. 第2回医工連携研究会. 2004.9.3 (東京大学医学部附属病院、東京)
4. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Hiroaki Takadama, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Biocompatible phospholipid polymer nano-grafting onto articular surface of the artificial hip joint prevents aseptic loosening. Nano-technology to prolong the longevity of the artificial joint. 17<sup>th</sup> Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA). 2004.9.23-25 (Roma, Italy)
5. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、瀧川順庸、高玉博朗、山脇昇、中村耕三、川口浩: ポリエチレンライナーのMPC処理は1000万サイクルまで摩耗を抑制する—ナノ表面制御による長寿命型人工股関節の開発—. 第31回日本股関節学会学術集会. 2004.10.15-16 (長崎ブリックホール、長崎)
6. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、瀧川順庸、中村耕三、川口浩: 整形外科における医工連携の課題 MPC ポリマーを用いたナノテクノロジーによる人工股関節の弛みの抑制 耐摩耗性と生体適合性に優れた長寿命型人工股関節の開発. 日本整形外科学会基礎学術集会. 2004. 10. 21-22 (新高輪プリンスホテル、東京).
7. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroaki Takadama, Takao Hanawa, Norio Maruyama, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial hip

joints by a novel biocompatible polymer MPC. 4<sup>th</sup> Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004.11.16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)

the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2005.2.23-27 (Washington D.C., USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

8. Toru Moro, Kazuhiko Ishihara, Ung-il Chung, Yoshio Takatori, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Nano-grafting of biocompatible MPC polymer on the polyethylene liner surface for preventing aseptic loosening of the artificial hip joints. Opening Seminar of “The Nano-Bioengineering Education Program, The University of Tokyo”. 2004.11.19 (Faculty of Engineering, The University of Tokyo, Japan)
9. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroaki Takadama, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: New biocompatible and wear-resistant articulating surface of artificial joints for preventing aseptic loosening. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2005.2.20-23 (Washington D.C., USA)
10. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Tomohiro Konno, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Biocompatible polymer grafting inhibits loosening of artificial joint based on macrophage activation. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of



には MPC 処理クロスリンクポリエチレン (以下 CL\_PE)ライナーを準備し、図 1 に示す MTS 社製人工股関節シミュレーターを用い、1000 万回の摩擦試験を実施した。

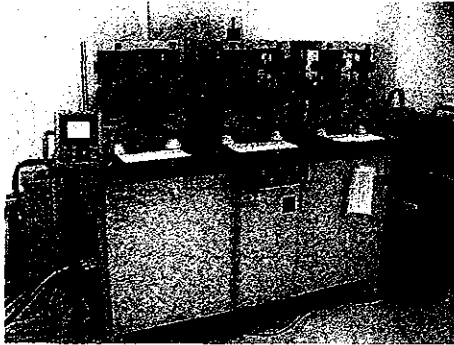


図 1 MTS 社製人工股関節シミュレーター

### 1. トルク試験

人工股関節シミュレーター試験前後の摩擦トルクについて、神戸製鋼所製人工股関節シミュレーターにて測定した (図 2)。図 3 に神戸製鋼所製人工股関節シミュレーター概要図を示す。

人工股関節シミュレーターに CL\_PE ライナーおよびコバルトクロム合金骨頭を取り付け、280 kgf の垂直荷重を負荷した。続いて、スイングアームを $\pm 30^\circ$ 揺動させ、発生した荷重をロードセルにより計測した。揺動周波数は 1 Hz、純水環境下にて行った。CL\_PE ライナーは、予備浸漬を行った。測定後、垂直荷重を 0 kgf に再設定し、上記方法にて荷重を計測した。280 kgf 負荷時の測定値と 0 kgf 負荷時の測定値の差分を揺力( $F_s$ )の真値とした。摩擦トルク( $T_f$ )は、次の式により算出した。 $L_A$  はアーム長を示し、本実験では 8 cm であった。

$$T_f = F_s \times L_A$$

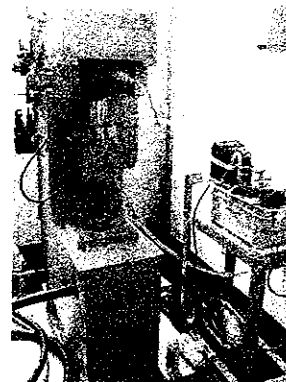


図 2 神戸製鋼所製人工股関節シミュレーター

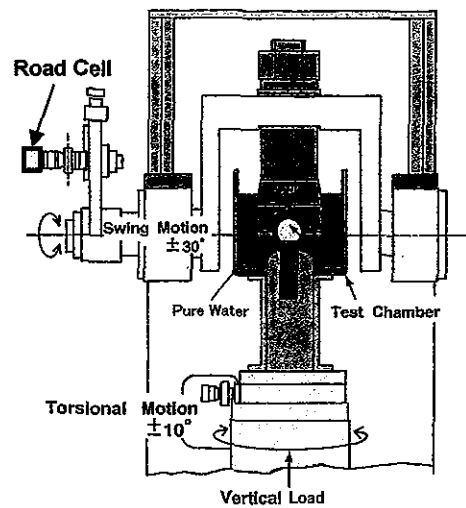


図 3 神戸製鋼所製人工股関節シミュレーター概要図

### 2. 金属骨頭の解析

人工股関節シミュレーター試験前後のコバルトクロム合金骨頭について、表面粗さ測定、表面観察を行った。

表面粗さ測定は、粗さ測定計を用い、骨頭天頂部、赤道部の算術平均粗さ (Ra) および最大高さ (Ry) を測定した。

骨頭の表面観察は、走査型電子顕微鏡 (SEM)にて行った。測定倍率は 2000 倍、10 kV の加速電圧とした。観察部位は、天頂部 A 点と  $45^\circ$ 部 B 点の 2 箇所とした (図 4)。

厚生労働科学研究費補助金（長寿総合研究事業）  
分担研究報告書

MPC ポリマー処理した関節摺動面の摩擦トルクと金属骨頭の解析

分担研究者 塙 隆夫（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授）  
丸山 典夫（独立行政法人物質・材料研究機構  
生体材料研究センター 主幹研究員）

研究要旨：長寿命型人工股関節の開発を目的に、生体適合性に優れたMPCポリマーを関節摺動部材であるポリエチレンの表面に導入した。長期人工股関節シミュレーター試験後の摺動特性を調査するため、金属骨頭-臼蓋ポリエチレンライナー間の摩擦トルク、および金属骨頭の表面性状解析を行った。その結果、MPC処理クロスリンクポリエチレンライナーは、著しく低い摩擦トルクを示した。一方、金属骨頭は、人工股関節シミュレーター試験前後で、その表面粗さに変化は無く、良好な表面性状を示した。また、金属組織観察より、対合するポリエチレンライナーのMPCの処理有無に関わらず、金属骨頭表面は同様の形態であることが確認された。以上から、MPC処理によって臼蓋ポリエチレンライナーは、長期に渡る摩耗試験においても良好な摩擦特性を有し、対合する金属骨頭への攻撃性も認められないことが確認された。

A. 研究目的

人工股関節において、骨頭-臼蓋ポリエチレンライナー間の摩擦によるポリエチレンの摩耗は、その寿命に影響を及ぼす因子の一つに挙げられる。骨頭-臼蓋ポリエチレンライナー間の摩擦抵抗が大きくなるにつれ、ポリエチレンの摩耗量が増加し、その摩耗粉の影響で人工股関節の寿命が短くなる可能性がある。

そこで、我々は、ポリエチレンライナー表面に親水性に優れた MPC 処理を施すことで、骨頭-臼蓋ポリエチレンライナー間で生じる摩擦の低減を

図った。既に、我々は、人工股関節シミュレーター試験 300 万回後の摩擦トルクの変化について報告した。本報では、MPC 処理ポリエチレンライナーについて、人工股関節シミュレーターにて 1000 万回におよぶ長期摩耗試験を実施し、骨頭-臼蓋ポリエチレンライナー間における摩擦トルクの変化を調査した。また、金属骨頭の表面性状についても調査した。

B. 研究方法

金属骨頭には  $\phi 26$  mm のコバルトクロム合金（神戸製鋼所製）、ライナー

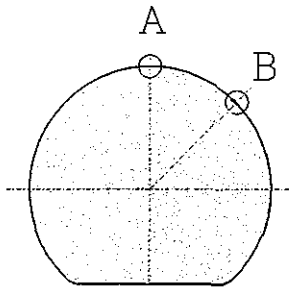


図4 骨頭 SEM 観察部位

C. 研究結果

1. トルク試験

摩擦トルクの計測結果を、図5に示す。

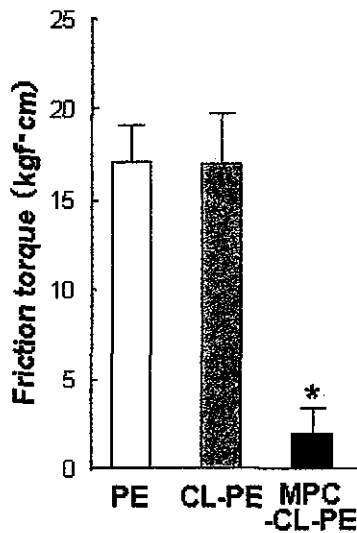


図5 280kgf 負荷時の摩擦トルク

図5より、人工股関節シミュレーター試験前のMPC処理有りCL\_PEライナーの摩擦トルクは、MPC処理無しPEライナー、MPC処理無しCL\_PEライナーの約1/10と、著しく改善していた。

2. コバルトクロム合金骨頭の解析

・表面粗さ測定

表1に、人工股関節シミュレーター試験前および1000万回後におけるコバルトクロム合金骨頭天頂部と赤道部の表面粗さ測定の結果を示す。試

験前後における骨頭の表面粗さに変化は見られなかった。また、対合するCL\_PEライナーのMPC処理有無による影響も認められなかった。

表1 骨頭表面粗さ測定結果

サイクル数 (万回)	測定箇所	単位: $\mu m$	
		MPC処理 有り	MPC処理 無し
0	天頂	Ra	0.05
		Ry	0.35
	赤道	Ra	0.05
		Ry	0.36
1000	天頂	Ra	0.04
		Ry	0.38
	赤道	Ra	0.05
		Ry	0.44

・表面 SEM 観察

図6に、人工股関節シミュレーター試験前のコバルトクロム合金骨頭、図7に、MPC処理CL\_PEライナーを用いて1000万回まで試験を行った骨頭、図8に、MPC処理無しCL\_PEライナーを用いて1000万回まで試験を行った骨頭の表面SEM写真について、各々示す。

人工股関節シミュレーター試験1000万回後のコバルトクロム合金骨頭表面の性状において、対合するCL\_PEライナーのMPC処理有無による影響を調査したが、表面粗さと同様に有意な差異は確認されなかった。

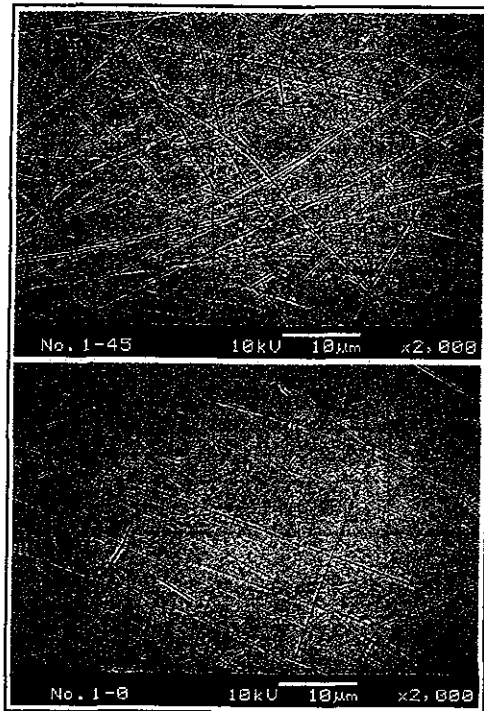


図 6 試験前のコバルトクロム合金骨頭表面 SEM 写真 (対合ライナー: MPC 処理 CL\_PE)

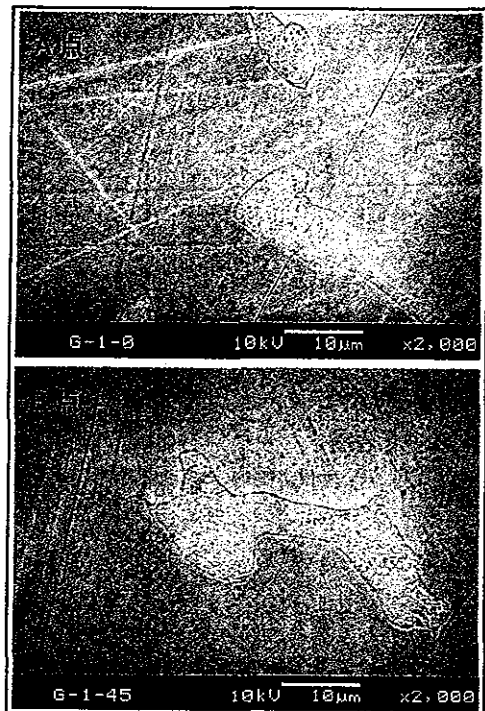


図 8 1000 万回試験後のコバルトクロム合金表面 SEM 写真 (対合ライナー: CL\_PE)

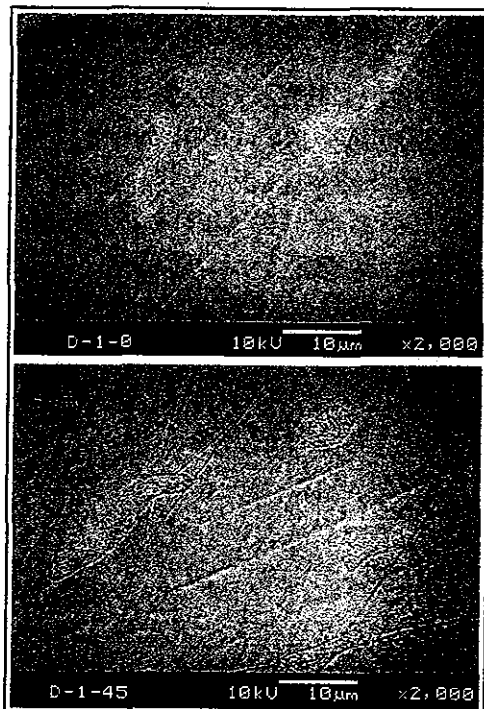


図 7 1000 万回試験後のコバルトクロム合金表面 SEM 写真 (対合ライナー: MPC 処理 CL\_PE)

#### D. 考察

MPC 処理により、コバルトクロム合金骨頭-CL\_PE ライナー間の摩擦トルクは顕著に改善し、その効果を発揮した。昨年の本研究開発に於いて、疎水性の PE ライナー表面に親水性の MPC ポリマーをグラフトさせることで、表層に自由水の層が形成されることを明らかにしたが、この結果、ライナー表面の潤滑機構が改善し、摩擦トルクが改善されている可能性があり、今後検討を続けていく必要がある。

人工股関節シミュレーター試験 1000 万回後のコバルトクロム合金骨頭は、対合する CL\_PE ライナーの MPC 処理有無に関わらず、良好な表面性状を示した。また、1000 万回におよぶ試験中においても異物混入による異常摩耗 (Third Body Wear) も認められなかった。

## E. 結論

MPC 処理はポリエチレンライナーの摩耗の要因となる摩擦トルクを低減させる技術であり、長期摩耗試験において対合する骨頭に対して攻撃性を認めないことから、長寿命型人工股関節の実現が期待される。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. A Yamamoto, Y. Kohyama, D. Kuroda and T. Hanawa: Cytotoxicity evaluation of Ni-free stainless steel manufactured by nitrogen adsorption treatment. *Mater. Sci. Eng.*, C24, 737-743 (2004).
2. A Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, and T. Hanawa: Cytotoxicity evaluation of ceramic particles with different sizes and shapes, *J. Biomed. Mater. Res.*, 68A, 244-256 (2004).
3. S. Hiromoto, and T. Hanawa: pH near Cells on Stainless Steel and Titanium, *Electrochemical and Solid State Letters*, 7, B9-B11 (2004).
4. S. Hiromoto, T. Hanawa, and K. Asami: Composition of surface oxide film of titanium with culturing murine fibroblasts L929, *Biomaterials*, 25, 979-986 (2004).
5. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibiru, S. Kuroda, and M. Kobayashi: Torsion and Tensile Properties of Thin Wires of Nickel-Free Stainless Steel with Nitrogen Absorption Treatment, *Mater. Trans.*, 45, 112-118, (2004).
6. S. Aoyagi, S. Hiromoto, T. Hanawa, and M. Kudo: TOF-SIMS Investigation of Metallic Material Surface After Culturing Cells, *Appl. Surf. Sci.*, 231/232, 470-474 (2004).
7. T. Hanawa, Y. Kohyama, S. Hiromoto, and A. Yamamoto: Effects of biological factors on the repassivation current of titanium, *Mater. Trans.*, 45, 1635-1639 (2004).
8. N. Ohtsu, K. Sato, K. Saito, T. Hanawa, and K. Asami: Evaluation of degradability of CaTiO<sub>3</sub> thin films in simulated body fluids, *Mater. Trans.*, 45, 1778-1781 (2004).
9. N. Maruyama, S. hiromoto, M. Ohnuma, and T. Hanawa: Fretting properties of Zr-Base bulk amorphous alloys in phosphate-buffered saline solution, *Mater. Trans.*, 45, 12333-1238 (2004).
10. D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hirabu, S. Kuroda, M. Kobayashi, and T. Kobayashi: Designing , processing

- and properties of advanced engineering materials, *Materials Science Forum*, 449, 1085-1088 (2004).
11. T. Hanawa: Metal ion release from metallic implants, *Mater. Sci. Eng., C24*, 745-752 (2004).
  12. M. Sumita, T. Hanawa and D. H. Teoh: Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials -review, *Mater. Sci. Eng., C24*, 753-760 (2004).
  13. 埴隆夫: 生体用金属材料の開発・評価の現状と将来戦略, *日本金属学会会報まてりあ*, 43 (3), 176-181 (2004).

## 2. 学会発表

1. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroaki Takadama, Takao Hanawa, Norio Maruyama, Kozo Nakamura and Hiroshi Kawaguchi: Inhibition of aseptic loosening of artificial hip joints by a novel biocompatible polymer MPC. 4<sup>th</sup> Asian International Symposium on Biomaterials (AISB). 2004.11.16-18 (Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿総合研究事業）  
分担研究報告書

MPC ポリマーの生物学的安全性に関する検討

分担研究者 高取吉雄（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 助教授）  
分担研究者 川口浩（東京大学医学部整形外科・脊椎外科 助教授）  
分担研究者 茂呂徹（東京大学大学院医学系研究科・助手）

研究要旨：長寿命型人工股関節の開発のため、人工股関節用超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）ライナー表面に生体適合性材料 MPC ポリマーを光グラフト重合（MPC ポリマー処理）し、著しい低摩耗を実現した。更に、本研究では、MPC ポリマー処理した UHMWPE の基礎的な生物学的安全性を調べる目的で、細菌を用いた復帰突然変異試験、培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験、染色体異常試験、感作性試験及びラットにおける骨内埋植試験を行った。いずれの試験結果も陰性であり、MPC ポリマーのナノ表面処理による生物学的安全性への影響はないと判断された。MPC ポリマー処理 UHMWPE は、著しい低摩耗を実現する人工股関節摺動部材であり、またその生物学的安全性も確認できたことから、将来的に長寿命型人工股関節として実用化することが期待できる。

A. 研究目的

生体関節は、運動機能を支える重要な器官であり、関節の疾患は日常生活動作に大きな支障をきたす。重度の関節疾患に対し、人工股関節置換術は、極めて有効な治療法の一つである。しかしながら、手術後 10 年で、関節摺動部の摩耗などにより発生した弛み（loosening）から再置換手術を余儀なくされる症例も少なくない。人工股関節摺動部の耐摩耗性の向上は、これらの観点から望まれており、人工股関節の長寿命化の一環として非常に重要な課題である。

我々は、先行研究において生体適合

性ポリマーである MPC ポリマーを光グラフト重合した UHMWPE 表面を創製し（以下 MPC ポリマー処理）、その耐摩耗性を人工股関節シミュレーターにより評価した。この結果、MPC ポリマー処理 UHMWPE の著しい低摩耗を確認した。

本研究では、MPC ポリマーでナノ表面処理した UHMWPE の基礎的な生物学的安全性を調べる目的で、MPC ポリマー処理 UHMWPE の、細菌を用いた復帰突然変異試験、培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験、染色体異常試験、感作性試験及びラットにおける骨内埋植試験を行った。

## B. 研究方法

人工股関節用 UHMWPE 表面に対し、MPC ポリマー処理した。これらを用い、以下に示す生物学的安全性試験を行った。

### ① MPC ポリマー処理 UHMWPE の細菌を用いた復帰突然変異試験

MPC ポリマー処理 UHMWPE の抽出液の細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、試験菌株に *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は、「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方」別添「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」別添「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について」および「新規化学物質等に係る試験方法について」に基づいて実施した。

MPC ポリマー処理 UHMWPE 被検体をガラス製容器に入れ、被検体の表面積 6 cm<sup>2</sup> に対してジメチルスルホキド (DMSO) を 1 mL の割合で加え、37°C、48 時間抽出し、これを試験原液とした。

試験は、代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合において、プレインキュベーション法により実施した。用量設定試験は、試験設定の通知等に準拠して行った。用量設定試験の結果、いずれの試験用量においても、被検体の抽出液による陽性反応、

生育阻害及び析出/沈殿は認められなかった。このため、本試験では、被検体の抽出液 (100%) の 100 µL/plate を最高用量とし、5 用量 (6.25~100 µL/plate) の試験用量を設定した。所定の濃度に調製した試験液について、37°C インキュベーター中にて、48 時間静置培養した。培養後、復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。

### ② MPC ポリマー処理 UHMWPE の培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

MPC ポリマー処理 UHMWPE からの抽出液について細胞毒性を評価することを目的とし、V79 細胞を用いたコロニー形成阻害試験を実施した。試験は、「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方」別添「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」別添「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について」に基づいて実施した。

被検体の表面積 60cm<sup>2</sup> に対し M05 培地 10 mL を加え、炭酸ガス培養器 (37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度) 中で 24 時間抽出した。これを抽出原液 (100%) とし、更に M05 培地を用いて希釈し、0.5~100% (試験 1) 及び 3.13~100% (試験 2) の濃度の試験液を調製した。100 個/mL に調製した細胞浮遊液を組織培養用プラスチックプレート 24 穴に各 0.5 mL 播種し、炭酸ガス培養器 (37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度) 中で約 6 時間培養し、細胞をウエル底面に接着させた。培養液を取り



除き、各濃度の被検体試験液と交換し、炭酸ガス培養器（37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度）中で6日間培養した。10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、0.1%メチレンブルー液で染色し、各ウェルで形成されたコロニー数を計測した。

### ③ MPCポリマー処理 UHMWPE の培養細胞を用いた染色体異常試験

培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討するため、MPCポリマー処理 UHMWPE の抽出液についてチャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞（CHL/IU細胞）を用いた染色体異常試験を実施した。試験は、「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方」別添「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」別添「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について」および「新規化学物質等に係る試験方法について」に基づいて実施した。

被検体の表面積 6 cm<sup>2</sup> に対し培地（Eagle's MEM）1 mL を加えて炭酸ガス培養器（37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度）中で48時間抽出し、これを抽出原液（100%）とした。この抽出原液を直接、あるいは培地を用いて希釈し試験液を調製した。これらを用い、短時間処理法及び連続処理法にて、染色体異常試験及び細胞増殖抑制試験を実施した。

短時間処理法による操作を以下に示す。単層に増殖した CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液処理により剥離

し、培地を用いて約 4 × 10<sup>3</sup> 個/mL の細胞浮遊液を調製した。直径 60 mm のプレートに、5 mL の浮遊液を入れ、炭酸ガス培養器（37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度）中で3日間培養した。培養後、プレート中の培地を試験液と交換した。代謝活性化による場合はプレート中の培地を 2.5 mL の試験液と交換し、S9Mix を 0.5 mL 添加した。代謝活性化によらない場合はプレート中の培地を 3.0 mL の試験液と交換した。培地交換後、以下の試験を行った。

### 細胞増殖抑制試験

処理したプレートを炭酸ガス培養器中で6時間培養後、新しい培地 5 mL と交換した。更に、18時間培養後、培地を捨て、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。染色後、モノセレーターにて細胞増殖率を評価した。

### 染色体異常試験

培地交換後、代謝活性化による場合は、ベンゾピレン溶液を 15 μL 添加し、代謝活性化によらない場合は *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン溶液を 15 μL 添加した。処理したプレートを炭酸ガス培養器中で6時間培養し、その後、新しい培地 5 mL と交換した。更に、18時間培養後、染色体標本作製した。標本作製は、以下の操作にて行った。培養終了2時間前にコルセミド溶液を 50 μL 添加した。培養終了後、0.2%トリプシン溶液処理により、細胞を剥離し、遠心管中で 0.075

mol/L 塩化カリウム溶液を用いて低張処理を施し、続いてカルノア固定液にて固定した。カルノア固定液に細胞を再浮遊させた後、エアードライ法によって標本作製し、1.5%ギムザ染色を行った。

連続処理法による操作を以下に示す。細胞の播種及び培養は、短時間処理法による操作と同様に行った。

#### 細胞増殖抑制試験

処理したプレートに炭酸ガス培養器中で24時間または48時間培養後、培地を捨て、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。染色後、モノセレーターにて細胞増殖率を評価した。

#### 染色体異常試験

処理したプレートに炭酸ガス培養器中で24時間または48時間培養後、染色体標本作製した。

#### ④ MPC ポリマー処理 UHMWPE の感作性試験

MPC ポリマー処理 UHMWPE を被検体とし、被検体からのクロロホルム抽出物について、モルモットに対する感作性の有無とその程度を Maximization Test 法により調査した。試験は、「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方」別添「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参

考資料について」別添「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について」に基づいて実施した。

被検体 60 個に、被検体の重量 1 g に対して 10 mL の割合でクロロホルムを加え、室温で 24 時間振とう抽出した。抽出後、濾紙で濾過し、濾過液を濃縮乾固して抽出物を得た。感作誘導 1 として、得られた抽出物に、被検体採取量と同量（抽出に用いた被検体 1 g に対する 1 mL の用量）のオリーブ油を加えて溶解させたもの（100%試験液）を皮内注射した。この翌週に、感作誘導 2 として、得られた抽出物に被検体採取量と同量のクロロホルムを加えて溶解させたもの（100%試験液）を 48 時間開放適用した。これらの試験動物に対して、感作誘導 2 の開始後 2 週間に、感作誘導 2 と同様に調整したものの希釈系列（100、50、10、5 及び 1%試験液）を用いて感作誘導を行った。

適用後、24、48 及び 72 時間に適用部位を観察し、皮膚反応の評価（表 1）に従って採点を行い、各群の平均評価点を算出した。また、各観察時間における陽性率（陽性動物数 / 1 群の動物数）× 100）を求めた。

表1 皮膚反応の評点

紅斑及び痂皮の形成			
紅斑なし	・・・		0
非常に軽度な紅斑(かろうじて識別できる)	・・・		1
はっきりした紅斑	・・・		2
中程度ないし高度紅斑	・・・		3
高度紅斑からわずかな痂皮の形成(深部損傷まで)	・・・		4
*出血、腫瘍及び壊死は深部損傷として点数4に分類する。			[最高点4]
浮腫の形成			
浮腫なし	・・・		0
非常に軽度な浮腫(かろうじて識別できる)	・・・		1
軽度浮腫(はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる)	・・・		2
中程度浮腫(約1mmの膨隆)	・・・		3
高度浮腫(1mm以上の膨隆と曝露範囲を超えた広がり)	・・・		4
			[最高点4]
[紅斑、痂皮及び浮腫の合計点数の最高点8]			

⑤ MPC ポリマー処理 UHMWPE のラット  
における骨内埋植試験

MPC ポリマー処理 UHMWPE を被検体として、ラットにおける骨内埋植試験を行った。試験は、「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方」別添「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」、「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」別添「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について」および「ISO 10993-6 Biological evaluation of medical devices-Part 6: Tests for local effects after implantation (1994)」に基づいて実施した。被検体形状は、φ1 mm x 2 mm の丸棒材とした。

右大腿骨内に被検体、左大腿骨内に陰性対照試料として高密度ポリエチレンロッドを埋植し、埋植部位について肉眼的及び病理組織学的検査を行った。埋植期間は4週、12週及び26

週、動物数は各埋植期間につき雌雄各7匹とした。

病理組織学的観察は以下の操作により行った。左右大腿骨を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、酸性脱灰液により脱灰した。脱灰後、5%硫酸ナトリウムで中和した。埋植試料を切り出した後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本作製した。得られた標本を用い、埋植部位の周囲に認められる組織反応について観察した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準総理府告示」、「東京大学医学部動物実験指針」に従い、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

① MPC ポリマー処理 UHMWPE の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験の結果、用量設定試験及び本試験ともに、被験物質処理群の復帰突然変異コロニー数の平均値は全て陰性対照群の2倍未満の値であり、再現性のある陰性結果が得られた(図1, 2)。被検体の抽出液による生育阻害及び被検体の析出、沈殿は、いずれの試験用量においても認められなかった。

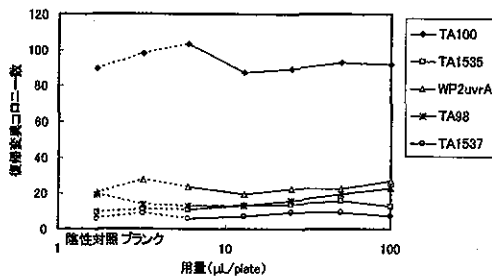


図1 用量-反応曲線 (代謝活性化によらない場合)

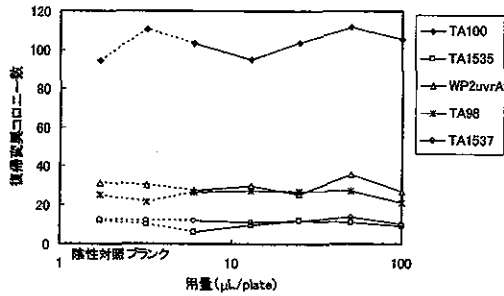


図2 用量-反応曲線 (代謝活性化による場合)

一方、陰性対照群及び陽性対照群の復帰突然変異コロニー数の平均値は管理値の範囲内であり、且つ、陽性対照群の値はそれぞれ陰性対照群の値の2倍以上であった。これらのことから、本試験系が適切な感受性を有して

いたことが確認された。

以上のことから、MPC ポリマー処理 UHMWPE の抽出液は、本試験条件下において、細菌における遺伝子突然変異誘発性を有しないものと結論した。

② MPC ポリマー処理 UHMWPE の培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

各試験区においてブランクコントロールにおけるコロニー形成能は良好であった。被検体試験液の各濃度におけるコロニー形成率は、ブランクコントロールに対して特に低下は認められなかった(図3)。

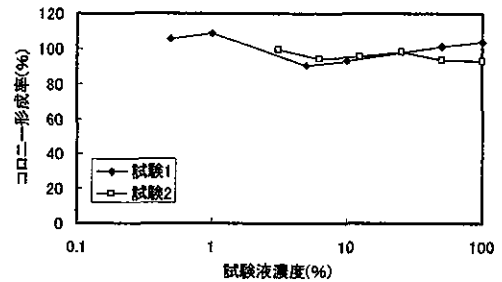


図3 被検体試験液のコロニー形成率

また、いずれの濃度の被検体試験液によって形成したコロニーにおいても、ブランクコントロールによって形成したコロニーと同程度の形状であった(図4)。

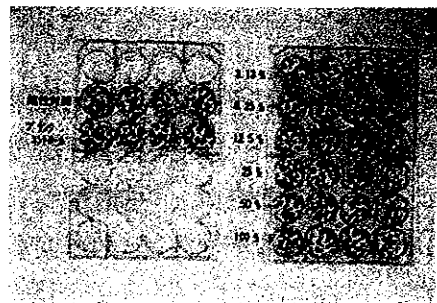


図4 コロニーの肉眼像