

- Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
17. Satoru Kamekura, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Ung-il Chung, Hirotaka Chikuda, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Establishment of novel experimental osteoarthritis models in mice. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
18. Toshiyuki Ikeda, Akihiko Mabuchi, Akira Fukuda, Satoru Kamekura, Ikuko Kou, S. Seki, Hisatada Hiraoka, Alira Kawakami, Seizo Yamamoto, Ung-il Chung, Yoshio Takatori, M. Takigawa, Hiroya Sakai, A. Sudo, A. Uchida, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, Shiro Ikegawa: Transcriptional induction of the gene encoding  $\alpha 3$  chain of type IX collagen (*COL9A3*) by SOX9 contributes to the susceptibility of knee osteoarthritis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
19. Toshiyuki Ikeda, Hiroshi Kawaguchi, Satoru Kamekura, Akihiko Mabuchi, I. Kou, Kazuto Hoshi, Kozo Nakamura, Shiro Ikegawa, Ung-il Chung: Combination of SOX5, SOX6 and SOX9 is sufficient for chondrogenesis. 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
20. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩：生体適合性に優れた人工材料・MPCによるナノ表面処理を用いた人工関節の弛緩防止—耐摩耗特性と摩耗粉に対する生体反応の評価—。第18回日本整形学会基礎学術集会。2003.10.16 (北九州国際会議場、小倉)。
21. 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、中村耕三、川口浩：ライナー表面のMPCポリマー処理は人工股関節のlooseningを抑制する。第30回日本股関節学会学術集会。2003.10.31-11.1 (ホテル日航東京、東京)。
22. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇：ポリエチレンライナー表面のMPCポリマー処理による人工関節の長寿命化。第25回バイオマテリアル学会。2003. 12. 16-17 (大阪国際会議場、大阪)。
23. 茂呂徹、中村耕三、高取吉雄、川

- 口浩、石原一彦、金野智浩、瀧川順庸、松下富春、山脇昇: MPC ポリマーによる関節摺動面のナノ表面処理は人工股関節の弛みを抑制する—長寿命型人工股関節の開発—。第34回 日本人工関節学会。2004.1.30-31 (幕張メッセ国際会議場、千葉)
24. Toru Moro, Yoshio Takatori, Kazuhiko Ishihara, Hiroshi Kawaguchi, Tomohiro Konno, Yorinobu Takigawa, Tomiharu Matsushita, Noboru Yamawaki, Kozo Nakamura: Grafting of biocompatible polymer on the polyethylene liner for improving longevity of the artificial joints. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2004.3.6-10 (Moscone West Convention Center, San Francisco, California, USA)
25. 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)
26. 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)
27. 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)
28. 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)
29. 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)

30. 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).
31. 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)
32. 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)
33. 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)
34. 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 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  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿総合研究事業）  
（総合）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）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、感受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 ポリマーによる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を実現する画期的な新技術とな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、感受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* WP2 *uvrA* 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℃、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℃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 60 cm<sup>2</sup> に対し M05 培地 10 mL を加え、炭酸ガス培養器 (37℃、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℃、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を作製し、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

処理したプレートを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

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

#### 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。

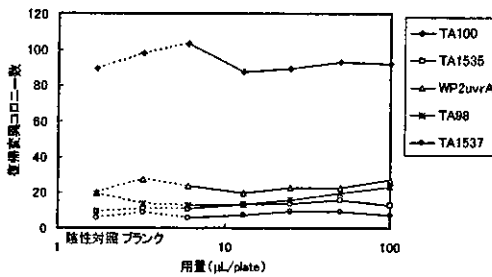


図1 用量-反応曲線 (代謝活性化によらない場合)

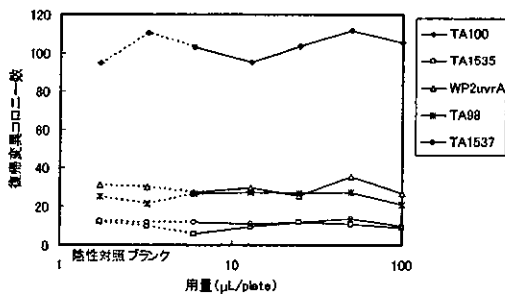


図2 用量-反応曲線 (代謝活性化による場合)

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)。

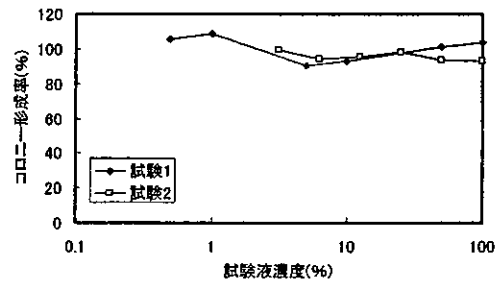


図3 被検体試験液のコロニー形成率

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)。

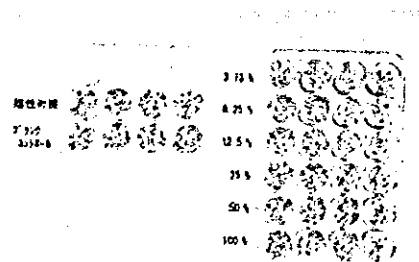


図4 コロニーの肉眼像

以上の結果から、被検体から得られた抽出液は本試験条件下において、細胞毒性を示さないものと考えられた。

### 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

被検体を培地で抽出した抽出液について、短時間処理法及び連続処理法のいずれの場合も 25~100%の濃度で試験を行ったところ、構造異常及び数的異常の出現頻度はいずれも 5%未満であった(図 5, 6)。

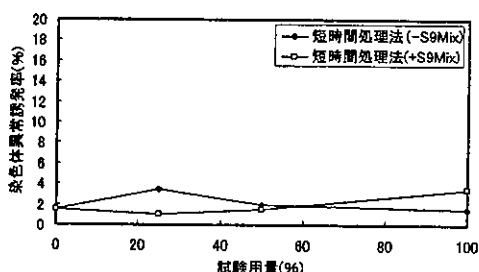


図 5 試験液濃度による染色体構造異常誘発率 (短時間処理法)

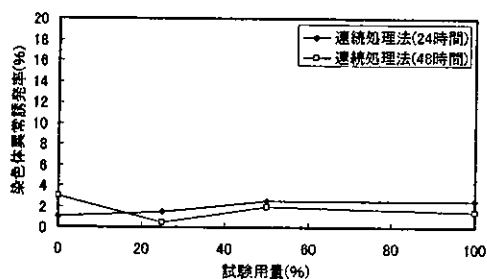


図 6 試験液濃度による染色体構造異常誘発率 (連続処理法)

染色体異常試験と同時に実施した細胞増殖抑制試験においては、細胞増殖の抑制は認められなかった(図 7, 8)。

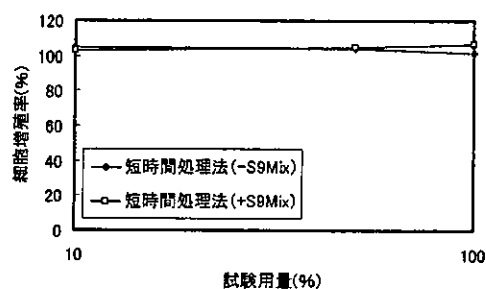


図 7 試験液濃度による細胞増殖率 (短時間処理法)

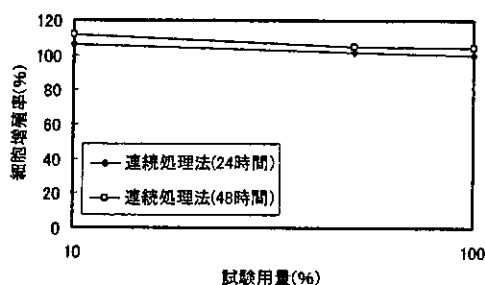


図 8 試験液濃度による細胞増殖率 (連続処理法)

従って、本試験条件下における被検体の染色体異常誘発性は、陰性と結論した。

### ④ MPC ポリマー処理 UHMWPE の感作性試験

図 9~11 に、適用後 24 時間の試験群、陰性対照群及び陽性対照群を示す。



図 9 適用後 24 時間の試験群

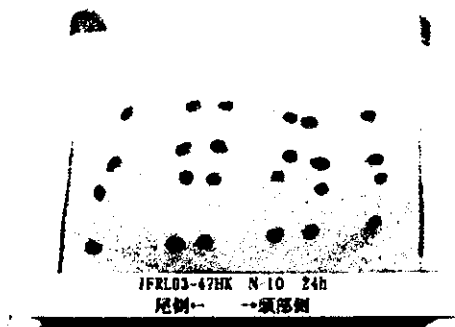


図 10 適用後 24 時間の陰性対照群

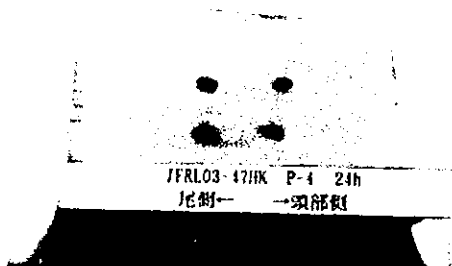


図 11 適用後 24 時間の陽性対照群

適用後、24、48 及び 72 時間の各観察時間において、いずれの適用部位においても皮膚反応は認められず、陽性率はいずれも 0%であった。

以上より、被検体は本試験条件下において皮膚感作性を有さないものと考えられた。

⑤ MPC ポリマー処理 UHMWPE のラットにおける骨内埋植試験

図 12～23 に、肉眼的外観観察写真を示す。

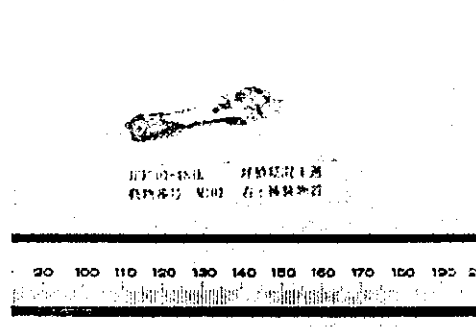


図 12 埋植 4 週(被検体, 雄)

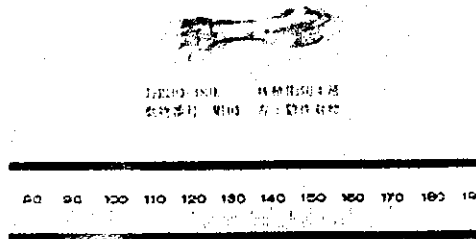


図 13 埋植 4 週(陰性対照試料, 雄)

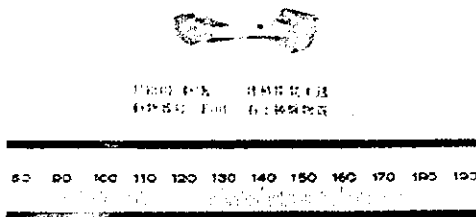


図 14 埋植 4 週(被検体, 雌)

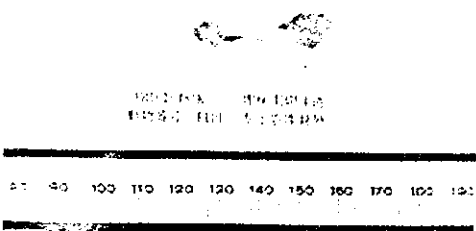


図 15 埋植 4 週(陰性対照試料, 雌)

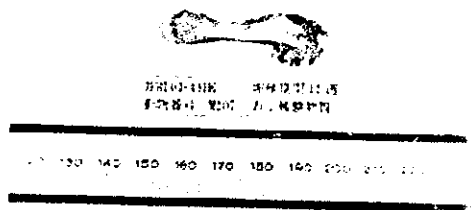


図 16 埋植 12 週 (被検体, 雄)

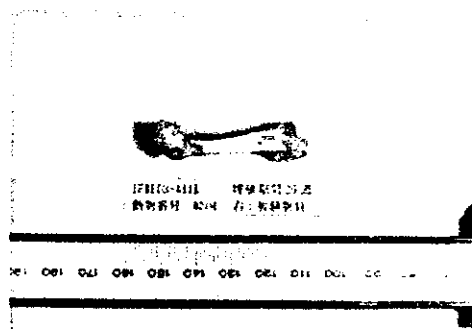


図 20 埋植 26 週 (被検体, 雄)

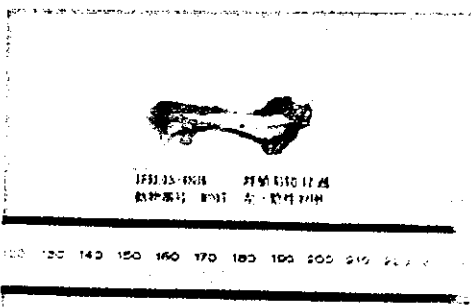


図 17 埋植 12 週 (陰性対照試料, 雄)

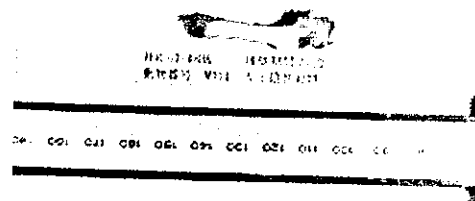


図 21 埋植 26 週 (陰性対照試料, 雄)

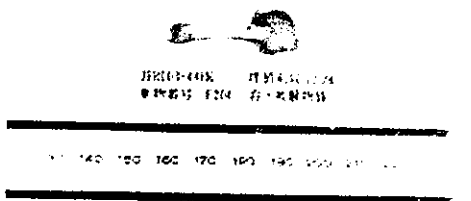


図 18 埋植 12 週 (被検体, 雌)

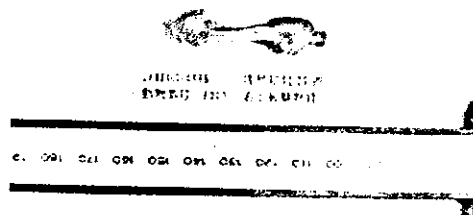


図 22 埋植 26 週 (被検体, 雌)

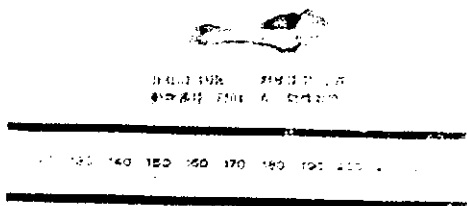


図 19 埋植 12 週 (陰性対照試料, 雌)

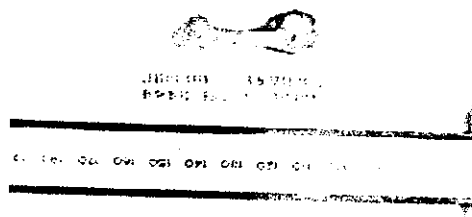


図 23 埋植 26 週 (陰性対照試料, 雌)

被検体を埋植した大腿骨では、いずれの埋植期間においても肉眼的に異常は見られなかった。また、病理組織学的検査においても明らかな炎症反応は認められず、埋植部位周囲に新生骨の形成及び繊維性被膜の増殖が部分的に見られるのみであった（図 24～35）。



図 27 埋植 4 週大腿骨(陰性対照試料, 雌)

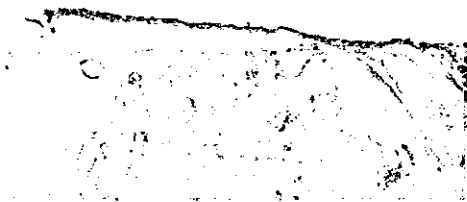


図 24 埋植 4 週大腿骨(被検体, 雄)

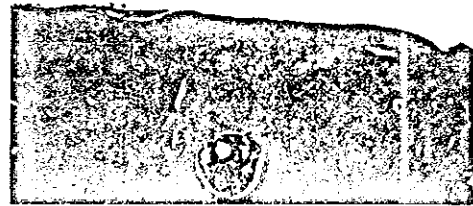


図 28 埋植 12 週大腿骨(被検体, 雄)



図 25 埋植 4 週大腿骨(陰性対照試料, 雄)



図 29 埋植 12 週大腿骨(陰性対照試料, 雄)

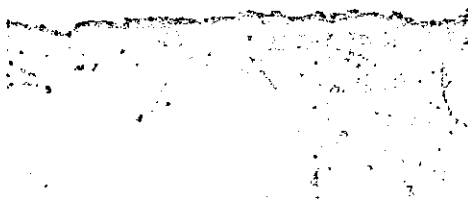


図 26 埋植 4 週大腿骨(被検体, 雌)

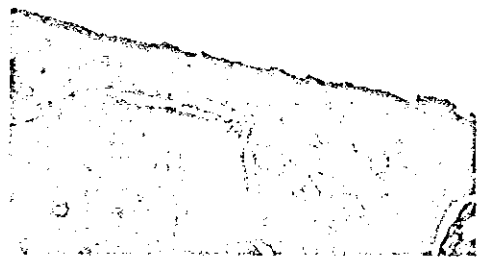


図 30 埋植 12 週大腿骨(被検体, 雌)



図 31 埋植 12 週大腿骨(陰性対照試料, 雌)



図 35 埋植 26 週大腿骨(陰性対照試料, 雌)



図 32 埋植 26 週大腿骨(被検体, 雄)

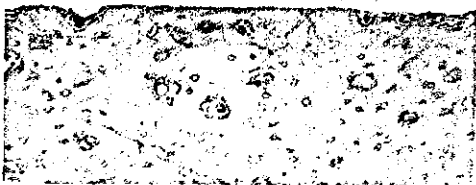


図 33 埋植 26 週大腿骨(陰性対照試料, 雄)

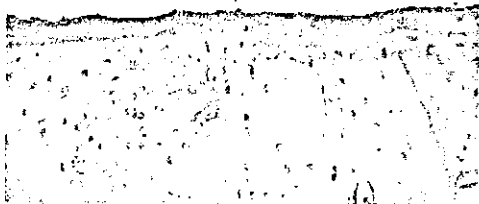


図 34 埋植 26 週大腿骨(被検体, 雌)

この所見は、陰性対照試料を埋植した大腿骨の組織反応と同様であり、その程度も同等であった。

以上から、被検体をラット大腿骨内へ埋植した場合の反応は、新生骨の形成及び繊維性被膜の増殖が主体であり、炎症や組織の変性を引き起こすことはないと考えられた。

#### D. 考察

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 の細菌を用いる復帰突然変異試験、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 ポリマーでナノ表面処理したことによる生物学的安全性への影響はないといえる。

#### E. 結論

本研究により、MPC ポリマーでナノ表面処理した UHMWPE の生物学的安全性が確認できた。関節摺動面の MPC ポリマー処理が摩耗粉の産生を長期にわたり抑制すること、MPC ポリマー摩耗粉が骨吸収を誘導しないことを考

え合わせると、長寿命型人工股関節を実現する画期的な新技術となることが期待できる。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshizuka Y, Yamada T, Hoshi K, Ogasawara T, Chung U, Kawano H, Nakamura Y, Nakamura K, Ikegawa S, and Kawaguchi H: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, may promote the last steps of the chondrocyte differentiation pathway. *J Biol Chem* 27848259-48266 (2003).
2. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung U, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, and Tanaka S: Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J* 22 6653-6664 (2003).
3. Saegusa M, Murakami M, Nakatani Y, Yamakawa K, Katagiri M, Matsuda K, Nakamura K, Kudo I, and Kawaguchi H: Contribution of membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase (mPGES) to bone resorption. *J Cell Physiol* 197 348-356 (2003).
4. Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly (ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* 24 4495-4506 (2003).
5. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Aihara K, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Metzger D, Chambon P, Nakamura K, Kawaguchi H, and Shigeaki Kato: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 9416-9421 (2003).
6. Seichi A, Nakajima S, Takeshita K, Kitagawa T, Akune T, Kawaguchi H, and Nakamura K: Image-guided resection of the thoracic ossification of the ligament flavum. *J Neurosurg* 99 60-63 (2003).
7. Ogihara S, Seichi A, Iwasaki M, Kawaguchi H, Kitagawa T, Tajiri Y, and Nakamura K: Concurrent spinal

- schwannomas and meningiomas. Case illustration. *J Neurosurg* 98 300 (2003).
8. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Takigawa Y, Matsushita T, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H: Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat Mater* 3(11):829-836 (2004).
  9. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H: PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113(6):846-855 (2004).
  10. Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI, Kawaguchi H: Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev* 18(19):2418-2429 (2004).
  11. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, Nakamura K: Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci* 9(4):410-414 (2004).
  12. Hoshi K, Ogata N, Shimoaka T, Terauchi Y, Kadowaki T, Kenmotsu S, Chung UI, Ozawa H, Nakamura K, Kawaguchi H: Deficiency of insulin receptor substrate-1 impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage. *J Bone Miner Res* 19(2):214-223 (2004).
  13. Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, Chung UI: The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50(11):3561-3573 (2004).
  14. Itaka K, Harada A, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J Gene Med* 6(1):76-84 (2004).
  15. Itaka K, Kanayama N, Nishiyama N, Jang WD, Yamasaki Y, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K: Supramolecular nanocarrier of



- siRNA from PEG-based block cationer carrying diamine side chain with distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing. *J Am Chem Soc* 126(42):13612-13613 (2004).
16. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 313(3):503-508 (2004).
17. Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Takato T, Nakamura K, Tanaka S, Okayama H, Kawaguchi H: Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kappaB-mediated downregulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19(7):1128-1136 (2004).
18. Ogasawara T, Kawaguchi H, Jinno S, Hoshi K, Itaka K, Takato T, Nakamura K, Okayama H: Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires Smad-mediated down-regulation of Cdk6. *Mol Cell Biol* 24(15):6560-6568 (2004).
19. Ohba S, Igawa K, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Chung UI: [Regenerative medicine of bone and cartilage]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 41(6):582-588 (2004).
20. Oohori Y, Seichi A, Kawaguchi H, Tajiri Y, Oda H, Nakamura K: Retroodontoid pseudotumor resected by a high cervical lateral approach in a rheumatoid arthritis patient: a case report. *J Orthop Sci* 9(1):90-93 (2004).
21. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Nakajima S, Akune T, Nakamura K: Postoperative expansion of intramedullary high-intensity areas on T2-weighted magnetic resonance imaging after cervical laminoplasty. *Spine* 29(13):1478-1482 (2004).
22. Seto H, Kamekura S, Miura T, Yamamoto A, Chikuda H, Ogata T, Hiraoka H, Oda H, Nakamura K, Kurosawa H, Chug UI, Kawaguchi H, Tanaka S: Distinct roles of Smad pathways and p38 pathways in cartilage-specific gene expression in synovial fibroblasts. *J Clin Invest* 113(5):718-726 (2004).
23. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung UI, Akune T, Maruyama Z, Komori T, Matsumoto M, Ogawa W, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H:

- Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279(15):15314-15322 (2004).
24. Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19(9):1452-1461 (2004).
25. Mabuchi A, Momohara S, Ohashi H, Takatori Y, Haga N, Nishimura G, Ikegawa S: Circulating COMP is decreased in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia patients carrying COMP mutations. *Am J Med Genet A* 129(1):35-38 (2004).
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).
27. 茂呂徹、高取吉雄、中村耕三、川口浩：関節のナノ表面処理による人工股関節の弛みの阻止. *整形外科* 56: 170 (2005).
28. Moro T, Ogasawara T, Chikuda H, Ikeda T, Ogata N, Maruyama Z, Komori T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Okayama H, Kawaguchi H: Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol.* in press
29. 茂呂徹: 人工関節 新素材採用で長寿命化に成功. *治療* in press
30. 茂呂徹: ナノ表面制御による新しい人工股関節の開発. *リウマチ科* in press
- 2.学会発表
1. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中島勸、阿久根徹、筑田博隆、中村耕三：頸椎椎弓形成術後にみられるMRI 髄内変化の拡大 - 前向き研究 -. 第32回日本脊椎脊髄病学会. 2003. 4. 4-6 (福岡).
2. 星地亜都司、中島勸、北川知明、竹下克志、阿久根徹、筑田博隆、川口浩、中村耕三：コンピューターナビゲーションシステムを用いた頸椎インストルメンテーション再手術. 第32回日本脊椎脊髄病学会. 2003. 4. 4-6 (福岡)
3. 川口浩、亀倉暁、池田敏之、池川志郎、中村耕三：Reverse & forward genetics を用いた変形性関節症の病態解明へのアプローチ. 第47回日本リウマチ学会総会 (シンポジウム：変形性関節症の発症機序と治療). 2003. 4. 24-25 (京

- 王プラザホテル、東京).
4. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中村耕三、川口浩、片岡一則：fluorescence resonance energy transfer (FRET)を用いた polyethylenimine/DNA polyplex の細胞内挙動の観察. 第3回遺伝子・デリバリー研究会. 2003. 5. 9 (KKR ホテル東京、東京).
  5. 星地亜都司、竹下克志、川口浩、中島勲、阿久根徹、筑田博隆、中村耕三：頸椎椎弓形成術後の上肢麻痺 - MRI による検討 -. 第76回日本整形外科学会学術集会. 2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
  6. 竹下克志、星地亜都司、岩崎元重、阿久根徹、川口浩、中村耕三：頸椎砂時計腫に対する片側椎弓・椎間関節切除に固定は必要か. 第76回日本整形外科学会学術集会. 2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
  7. 阿久根徹、川口浩、緒方直史、星地亜都司、大西五三男、中村耕三：脊椎後縦靭帯骨化症の骨化傾向と糖代謝関連因子の検討. 第76回日本整形外科学会学術集会. 2003. 5. 22-25 (石川県立音楽堂、金沢).
  8. 松田浩一、井上耕一、阿久根徹、星和人、河野博隆、山川聖史、中村祐輔、中村耕三、川口浩：メカニカルストレスに反応して骨量維持に働く新規遺伝子 Znt5 (Zinc transporter 5) の単離と機能解析 (学会奨励賞受賞). 第21回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
  9. 池田敏之、馬淵昭彦、亀倉暁、福田明、平岡久忠、鄭雄一、川口浩、高取吉雄、滝川正春、木村友厚、須藤啓広、内田淳正、中村耕三、池川志郎：Sox9 による IX 型コラーゲン $\alpha$ 3 鎖遺伝子の転写誘導は変形性膝関節症の発症に関与する (学会奨励賞受賞). 第21回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
  10. 亀倉暁、星和人、下赤隆、筑田博隆、鄭雄一、中村耕三、川口浩：マウス変形性関節症(OA)誘発モデルの確立とこれを用いた OA 発症における MMP-13 の関与. 第21回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
  11. 池田敏之、亀倉暁、馬淵昭彦、関庄二、黄郁代、筑田博隆、鄭雄一、木村友厚、川口浩、中村耕三、池川志郎：軟骨再生医療を目指した SOX9/SOX5/SOX6 の遺伝子同時

- 導入による軟骨誘導. 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
12. 大庭伸介、池田敏之、矢野文子、釘宮典孝、筑田博隆、高戸毅、中村耕三、Alex Lichter、川口浩、鄭雄一: COL1-GFP マーカー遺伝子導入による幹細胞から骨芽細胞への分化モニタリングシステムの開発. 第 21 回日本骨代謝学会 (IBMS-JSBMR 2003). 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
  13. Hirotaka Chikuda, Kazuto Hoshi, Takashi Shimoaka, Toru Akune, Hirotaka Kawano, Ken-ichi Kawano, Kozo Nakamura, Kajuro Komeda, Ung-il Chung, Hiroshi Kawaguchi: Dysfunction of cGMP-dependent protein kinase 2 causes dissociation of proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in Minature rat Ishilawa (Travel Award 受賞). IBMS-JSBMR 2003. 2003. 6. 3-7 (大阪国際会議場、大阪).
  14. 位高啓史、原田敦史、山崎裕一、中村耕三、川口浩、片岡一則: Linear ポリエチレンイミンの高遺伝子発現メカニズム- FRET を用いた細胞内観察. 第 19 回日本 DDS 学会. 2003. 6. 19-20 (国立京都国際会館、京都).
  15. Koichi Matsuda, Koichi Inoue, Kiyofumi Yamakawa, Hirotaka Kawano, Toru Akune, Kazuto Hoshi, Yusuke Nakamura, Kozo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi: Zinc transporter 5 (Znt5) is an essential molecule for mechanical stress signaling in bone (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).
  16. Takashi Yamada, Hirotaka Kawano, Toru Fukuda, K. Yoshimura, Takashi Nakamura, Satoru Kamekura, Ung-il Chung, Yu Koshizuka, Kozo Nakamura, Shigeaki Kato, Hiroshi Kawaguchi: Cystatin 10, a novel chondrocyte-specific protein, contributes to pathogenesis of osteoarthritis and ectopic ossification through chondrocyte calcification (Young Investigator Award). 25th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003. 9.19-23 (Minneapolis, Minnesota, USA).