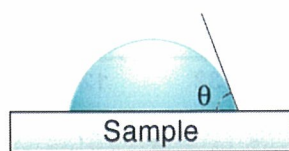


マー処理したCCM合金の表面を全反射フーリエ変換赤外吸収スペクトル(ATR-FTIR)、接触角測定(図3)ならびにX線光電子分光分析(XPS, 図3)により解析した。また、グラフトポリマーの表面分布をローダミン6Gで染色することにより調べた。

接触角測定



X線光電子分光分析

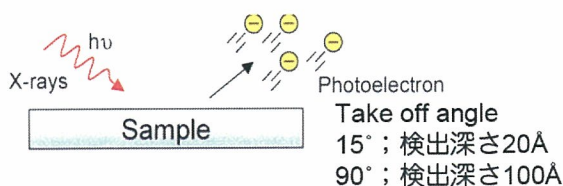


図3 表面分析法

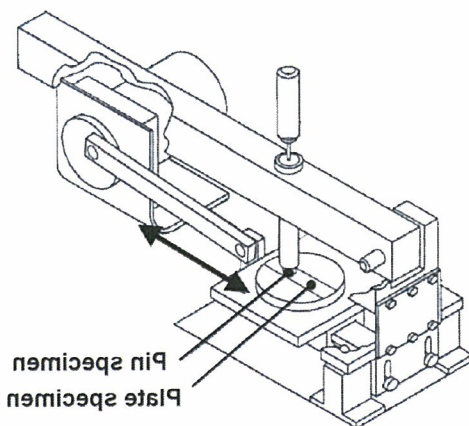


図4 Pin-on-plate 装置

Poly(MPC) (PMPC) をグラフトした表面の摩擦試験は図4

に示すpin-on-plate装置を用いて行った。評価には高さ直径9mm高さ5mmのシリンダー状のピンを用いた。測定は、25%のウシ血清を擬似体液として用い、2.4MPaの荷重をかけながらピンを1Hz、25mmの振り幅で最大 $5 \times 10^4$ サイクル動かし行った。

C. 研究結果

図5に硝酸および酸素プラズマ処理したCCM合金表面とMPCをグラフト重合した表面のFT-IRスペクトルを示す。グラフト重合により $1720\text{ cm}^{-1}$ にC=O、 $1550\text{ cm}^{-1}$ に芳香環由来の吸収が確認され、 $1080\text{ cm}^{-1}$ 、 $970\text{ cm}^{-1}$ にMPCユニットに含まれるリン酸エステル由来の吸収が認められた。

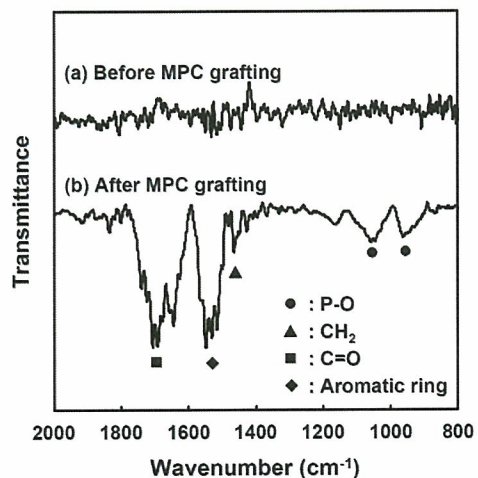


図5 PMPCを修飾した表面の赤外吸収スペクトル

図6にMPCをグラフト重合したCCM表面のXPSスペクトルを示

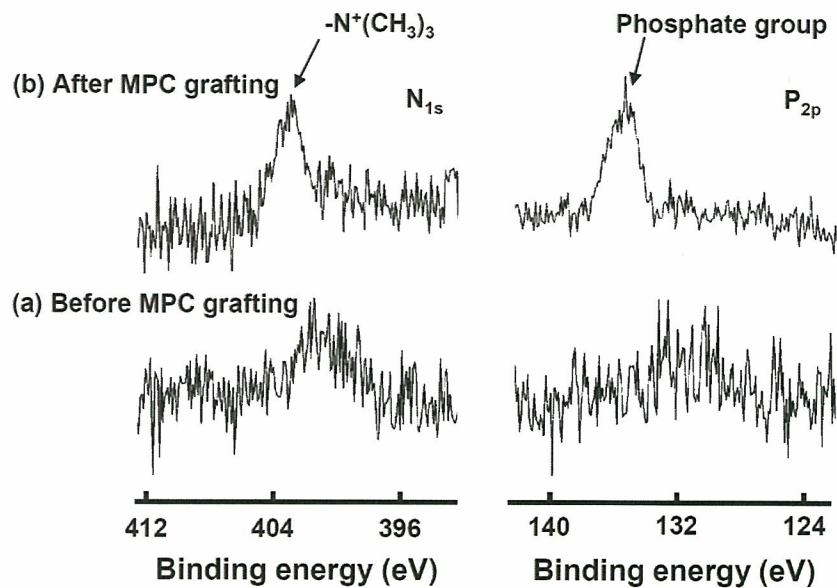


図6 PMPCを修飾した表面のXPSスペクトル

表1 XPS解析より求めた表面の元素比

Pre-treatment	MPC treatment	C <sub>1s</sub>	O <sub>1s</sub>	N <sub>1s</sub>	P <sub>2p</sub>	Co <sub>2p</sub>	Cr <sub>2p</sub>	Mo <sub>3d</sub>
Nitric acid+ O <sub>2</sub> plasma	Untreated	14.6 (1.3)	52.9 (2.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	26.7 (1.5)	5.4 (0.2)	0.4 (0.0)
Untreated		52.3 (1.3)	35.3 (0.4)	0.3 (0.2)	0.9 (0.1)	4.8 (0.8)	5.6 (1.1)	0.8 (0.1)
Nitric acid	MPC treatment	52.1 (1.1)	36.2 (0.7)	0.4 (0.2)	1.6 (0.2)	3.4 (0.4)	5.7 (0.7)	0.7 (0.2)
O <sub>2</sub> plasma		42.1 (1.1)	45.6 (1.1)	0.2 (0.2)	1.0 (0.1)	10.5 (0.7)	0.4 (0.5)	0.2 (0.1)
Nitric acid+ O <sub>2</sub> plasma		63.3 (0.6)	30.8 (0.7)	3.0 (0.2)	2.9 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
MPC polymer*		57.9	31.6	5.3	5.3	—	—	—

\*: Theoretical elemental composition of MPC polymer. The standard deviations are shown in parentheses.

す。未処理の表面では観察されなかったMPCユニットに含まれるリンおよび窒素由来のシグナルが確認された。表1にCCM合金の前処理に伴う表面の元素比をまとめた。前処理の方法によりMPCユニット由来のP、Nの組成に違いが生じ、硝酸および酸素

プラズマで処理した表面でこれらの元素比は最も高くなった。

図7に前処理方法の異なる条件でMPCをグラフト重合した表面における水の接触角を示す。MPCをグラフトと重合する前は、いずれも同様に80°程度であった。MPCをグラフト

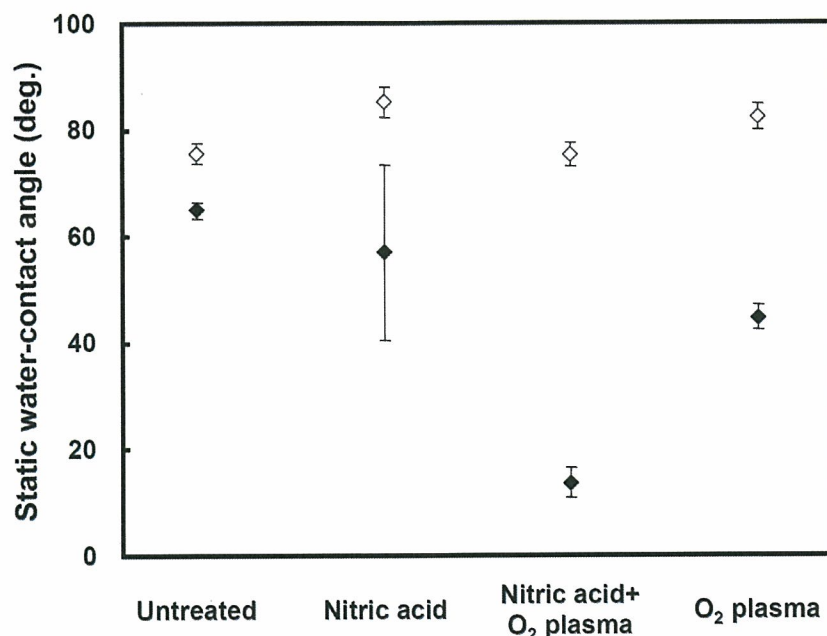


図7 PMPCを修飾した表面の接触角

重合することによりいずれのサンプルにおいても接触角は低下した。特に、硝酸および酸素プラズマで処理した表面で接触角の低下が顕著に認められた。

図8にローダミン6Gで染色したPMPCグラフト表面の蛍光顕微鏡像を示す。PMPCをグラフトする前の表面では、ローダミン6Gの吸着が起らず、蛍光が確認されなかったのに対し、PMPCをグラフトした表面では、ローダミン6Gの吸着が起り、蛍光が観察された。しかし、ローダミン6Gの分布が均一ではなく、蛍光像に斑が観察された。

図9にPin-on-plate法により求めた摩擦係数を示す。プレート側に未処理のCCM合金とPMPCをグラフトした表面を用い、ピンとして未処理のCCM合金、PMPCを

グラフトしたCCM合金、架橋ポリエチレン(CLPE)、PMPCをグラフトした架橋ポリエチレン(CLPE)を使用した。未処理のCCM合金同士で試験した場合、 $1 \times 10^1$ サイクルでおよそ0.24であった摩擦係数が $5 \times 10^4$ 回後では0.38まで上昇した。一方CCM合金とCLPEとの摩擦係数は0.1程度であり、 $5 \times 10^4$ サイクル後においても大きな変化は認められなかった。プレート側にPMPCをグラフトすることにより、摩擦係数は有意に低下した。しかし、金属/金属の摩擦試験では $5 \times 10^4$ サイクル試験を行ったところ、摩擦係数は未処理と同等の値まで上昇した。一方、PMPCをグラフトしたCCM合金表面とCLPEの摩擦係数は0.05と最も小さく、 $5 \times 10^4$ サイクル試験後もその値は安定していた。CLPE

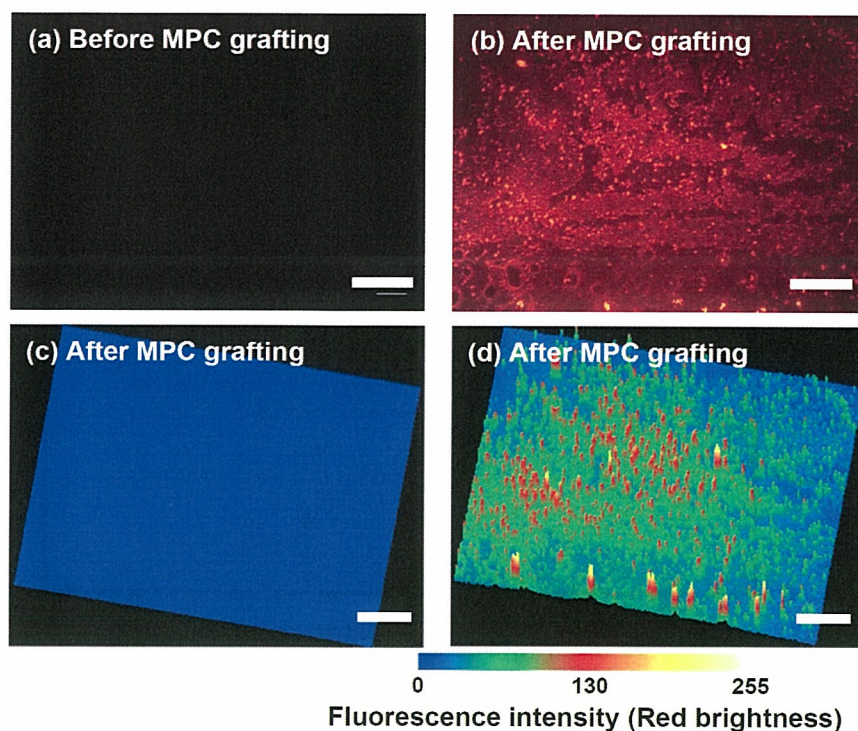


図8 ローダミン6GによるPMPCの分布確認

にもPMPCをグラフトするとその摩擦係数は若干大きくなった。

D. 考察

本研究では、CCM合金の表面をP

MPC修飾し、表面の潤滑性を改善することを目的とした。金属接着性モノマーである4-METAを塗布したCCM合金、光重合によりMPCをグラフト重合した。

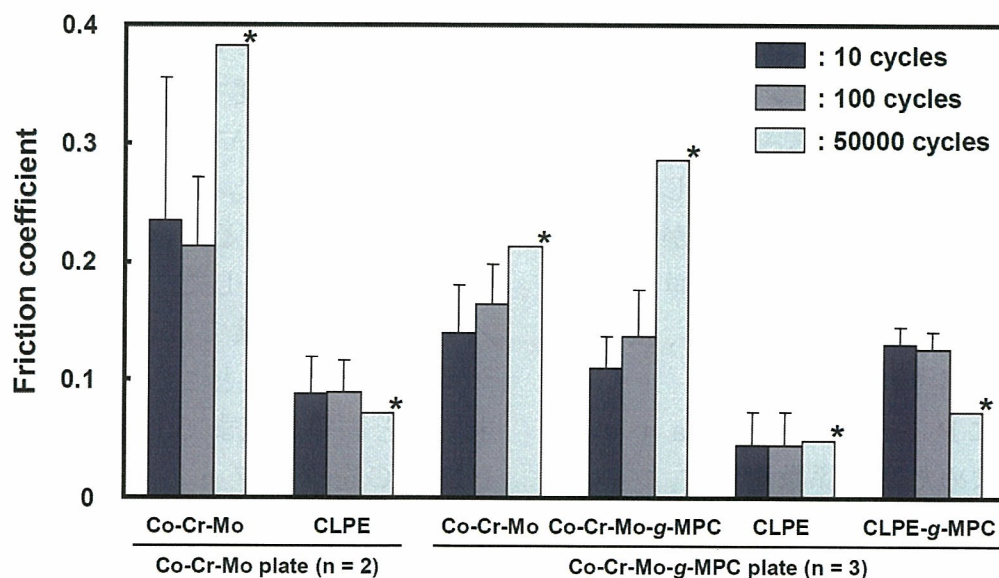


図9 Pin-on-plate法により求めた表面の摩擦係数

条件を変えて正面を洗浄したCCM合金の表面をXPSで解析したところ、硝酸処理と酸素プラズマ処理で続けて洗浄した試料で酸素濃度が高くなり、最も効率よく酸化の形成が行われていることが明らかとなった。

前処理後、4-METAを塗布し、MPCを光重合したところ、前処理の方法によりPMP Cのグラフト密度や接触角が異なることが明らかとなった。酸化膜の形成がPMP Cのグラフトに重要であることがわかった。

表面にグラフトしたPMP Cを蛍光色素で染色し、グラフト鎖の表面分布を調べたところ、未処理の表面に比べ顕著な蛍光色素の吸着が確認され、PMP Cの存在が明らかとなったが、蛍光色素の吸着は均一でなく、密なところと疎なところの分布が認められた。蛍光観察は間接的な評価であるものの、PE表面にMPCをグラフトした場合に比べ、均一性に乏しいため、重合法などを改良する必要がある。

図9に示した摩擦試験の結果より、PMP Cをグラフト表面は、未処理の表面に比べ摩擦を低減することがわかった。しかし、PMP Cを修飾したプレートをCCMのピンまたはPMP Cを修飾したCCMのピンでこすった時、 $1 \times 10^2$ サイクルでは小さい摩擦定数を維持していたが、 $5 \times 10^4$ サイクルでは、著しい摩擦定数の上昇が確認され、被覆安定性の向上が必要であることが示唆された。一方、CLPEのピンを用いて摩擦試験を行った場合には、摩擦係数が0.05と非

常に小さく、 $5 \times 10^4$ サイクル後も摩擦係数の上昇は認められなかった。CCMとCLPEの双方にPMP Cをグラフトした場合には、若干摩擦係数の上昇が認められた。PMP CのグラフトによりCCM合金の表面摩擦を低減できることが明らかとなったが、その効果は界面を形成する材料の種類によって異なり、表面形態を条件によって最適化する必要がある。

## E. 結論

金属表面の潤滑性を高めるためにPMP Cの表面グラフト法とその効果を調べた。CCMの前処理条件によりPMP Cのグラフト効率が異なり、CCM表面に酸化膜を形成させることが重要であることがわかった。PMP Cを修飾したCCM表面の潤滑性は未処理の表面に比べ効果的に改善されたが、更なる修飾安定性の向上とグラフト層の均一化の必要性も認められた。今後表面グラフト重合法などを適用し、更なる性能改善を目指す。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Patel J, Iwasaki Y, Ishihara K, and Anderson JM: Phospholipid polymer surfaces yield reduced bacterial and leukocyte adhesion under dynamic flow conditions. *J. Biomed. Mater. Res.* 73A: 359-366, 2005
- 2) Iwasaki Y, Tabata E, Kurita K,

- Akiyoshi K: Selective cell attachment to a biomimetic polymer surface through the recognition of cell-surface tags. *Bioconjugate Chem.* 16: 567-575, 2005
- 3) Morimoto N, Endo T, Ohtomi M, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Hybrid nanogels with physical and chemical cross-linking structures as drug carrier. *Macromol. Biosci.* 5: 710-716, 2005
- 4) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K, Takahara A: Well-controlled nanobiointerface generated from phosphorylcholine block copolymers brushes via a "grafting from process. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* 30: 735-738, 2005
- 5) Hatsuno K, Mukohyama H, Horiuchi S, Iwasaki Y, Yamamoto N, Akiyoshi K, Taniguchi H: Poly(MPC-co-BMA) coating reduces the adhesion of *Candida albicans* to poly(methyl methacrylate) surfaces. *Prosthodont. Res. Pract.* 5: 21-25, 2006
- 6) Iwasaki Y, Akiyoshi K: Synthesis and characterization of amphiphilic polyphosphates with hydrophobic graft chains and cholesteryl groups as nanocarriers. *Biomacromolecules* 7: 1433-1438, 2006
- 7) Sawada S, Iwasaki Y, Nakabayashi N, Ishihara K: Stress response of adherent cells on a blend polymer surface composed of a segmented polyurethane and MPC copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 79A: 476-484, 2006
- 8) Iwasaki Y, Akiyoshi K: Highly wettable polyethylene films generated by spontaneous surface enrichment of perfluoroalkylated phosphorylcholines. *J Appl Polym Sci* 102: 2868-2874, 2006
- 9) Fukushima O, Yoneyama T, Doi H, Hanawa T: Corrosion resistance and surface characterization of electrolyzed Ti-Ni alloy. *Dent Mater J* 25: 151-160, 2006
- 10) Tomizawa Y, Hanawa T, Kuroda D, Nishida H, Endo M: Corrosion of stainless sternal wire after long-term implantation. *J Artif Organ* 9: 61-66, 2006
- 11) Kobayashi E, Mochizuki H, Doi H, Yoneyama T, Hanawa T: Fatigue life prediction of biomedical titanium alloys under tensile/torsional stress. *Mater Trans* 47: 1826-1831, 2006
- 12) Iwasaki Y, Takamiya M, Iwata R, Yusa S, Akiyoshi K: Surface modification with well-defined biocompatible triblock copolymers -Improvement of biointerfacial phenomena on a poly (dimethylsiloxane) surface-. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* in press.
- 13) Kyomoto M, Iwasaki Y, Moro T, Konno T, Miyaji F, Ishihara K, "High lubricious surface of cobalt-chromium-molybdenum alloy created by grafting with poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *Biomaterials* in press.

## 2.学会発表

### ① 海外発表

- 1) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Synthesis of well-defined biocompatible phosphorylcholine polymer brushes for nanobiointerfaces. *International symposium on functional colloids and surfaces*, Hiyoshi, Japan, January, 2005.
  - 2) Iwasaki Y, Tabata E, Akiyoshi K: Control of cell attachment to a biomembrane-like surface through the recognition of cell surface tags. *Society for Biomaterials 30th Annual Meeting & Exposition*, Memphis, USA, April, 2005.
  - 3) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Fabrication of Well-defined Block Polymer Brushes for Nano-biointerfaces. *19th European Conference on Biomaterials*, Naples, Sorrento, September, 2005.
  - 4) Iwasaki Y, Tabata E, Akiyoshi K: Specific cell attachment to a phosphorylcholine polymer surfaces through the recognition of cell membrane tags. *Pacific Polymer Conference IX*, Maui, USA, December, 2005.
  - 5) Iwasaki Y: Phosphorylcholine Polymers for Biomaterials. *Seminar, Chemical Engineering*. Nashville, USA, April, 2006.
  - 6) Iwasaki Y: Design of phosphorylcholine polymers for biomaterials. *Seminar, Physico-Chimie des Polymères et Milieux Dispersés ESPCI*. Paris, France, September, 2006.
  - 7) Maie H, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Polymeric nanoparticles as cell-specific drug carriers. *Society for Biomaterials 31st Annual Meeting & Exposition*, Pittsburgh, USA, April, 2006.
  - 8) Iwasaki Y, Akiyoshi K: Spontaneous enrichment of photophorylcholine groups on polyolefin surface with perfluoroalkylated lipids additives. *Society for Biomaterials 31st Annual Meeting & Exposition*, Pittsburgh, USA, April, 2006.
  - 9) Iwasaki Y, Takamiya M, Iwata R, Akiyoshi K: Surface Modification of Silicone with Well-Defined Phospholipid Polymer. *20th European Conference on Biomaterials*, Nantes, France, September, 2006.
  - 10) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Covalent Immobilization of Nanoparticle Uptake by Endothelial Cells. *20th European Conference on Biomaterials*, Nantes, France, September, 2006.
  - 11) Iwasaki Y, Akiyoshi K: Amphiphilic Biodegradable Polyphosphoesters. *The Annual Hamburg Macromolecular Symposium*, Hamburg, Germany, October, 2006.
  - 12) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Protein Immobilized Block Copolymer Brushes for Well-defined Biointerface. *The Annual Hamburg Macromolecular Symposium*, Hamburg, Germany, October, 2006.
- ② 国内発表
- 1) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: タンパク質集積に適した精密ブロックポリマー表面の調製. 第54回高分子学会年次大会, 横浜, 2005年5月.

- 2) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 高密度リン脂質ポリマーブラシによるバイオインターフェイスの精密制御. **第34回医用高分子シンポジウム**, 東京, 2005年8月.
- 3) 岩崎泰彦, 秋吉一成, 越野有子, 栗田公夫: 生体に倣った両親媒性ポリマーの精密設計と会合特性. **第34回医用高分子シンポジウム**, 東京, 2005年8月.
- 4) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 高感度バイオ認識界面の創製を目指したブロックポリマーブラシの精密設計. **第54回高分子討論会**, 山形, 2005年9月.
- 5) 岩崎泰彦: 生体に倣ったポリマーバイオマテリアル. **日本油化学会若手の会**, 愛知, 2006年8月.
- 6) 岩崎泰彦, 篠原由里香, 栗田公夫, 秋吉一成: 生体膜糖鎖インスパイアード界面の設計と機能. **第55回高分子学会年次大会**, 名古屋, 2006年5月.
- 7) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 精密ブロックポリマーブラシの調製とバイオ認識界面創製に向けた機能化. **第55回高分子学会年次大会**, 名古屋, 2006年5月.
- 8) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 抗体固定化ブロックポリマーブラシの調整と機能. **第35回医用高分子シンポジウム**, 東京, 2006年8月.
- 9) 岩崎泰彦, 秋吉一成, 篠原由里香, 高見詩恵, 栗田公夫: 細胞膜表面構造に倣ったポリマーによるバイオ認識界面の構築. **第55回高分子討論会**, 富山, 2006年9月.
- 10) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 抗体固定化ブロックポリマーブラシの調整とバイオ認識界面への応用. **第55回高分子討論会**, 富山, 2006年9月.
- 11) 真家春樹, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 細胞に誘導した非天然糖鎖を標的とするナノ粒子によるDDS. **第55回高分子討論会**, 富山, 2006年9月.
- 12) 米山隆之, 岩崎泰彦, 福島修, 土居壽, 小林郁夫, 塙隆夫: Ti-Ni合金表面に被覆したMPCポリマーの安定性とタンパク質吸着性. **平成17年度秋期第46回日本歯科理工学会学術講演会**, 長崎, 2006年9月15-16.
- 13) 真家春樹, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 細胞膜に誘導した非天然糖鎖を標的とするナノ粒子によるDDS. **第28回日本バイオマテリアル学会**, 東京, 2006年11月.
- 14) 岩崎泰彦, 高宮美香, 岩田綾子, 遊佐慎一, 秋吉一成: 精密合成されたリン脂質ポリマーによる生体機能界面の構築. **第28回日本バイオマテリアル学会**, 2006年11月.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特願2006-91544  
「生体材料、及びそれを用いた人工関節並びにその製造方法」  
特願：2006-91544  
出願日：2006.03.29  
同様の内容で国際出願を予定



厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

MPC ポリマー処理したポリエチレン表面の生体内安全性の検討

分担研究者 川口浩 （東京大学医学部附属病院 助教授）

研究要旨：本研究では、MPC ポリマー処理した超高分子量ポリエチレン（Ultra high molecular weight polyethylene：UHMWPE）の生物学的安全性を調べる目的で、MPC 処理 UHMWPE の 90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験を日本白色種ウサギを用いて実施した。MPC 処理を施した UHMWPE を埋植する被験物質埋植群および MPC 処理を施していない UHMWPE を対照として埋植する対照物質埋植群の計 2 群を設定し、埋食後 90 日間観察した。試験には各群 8 匹、計 16 匹の動物を使用した。病理組織学的には、対照物質埋植群を含む各群において、膝関節埋植部の大腿骨における埋植試料と接する部位で、ごく軽度から中程度の軟骨芽細胞、骨芽細胞、軟骨組織、骨組織、および線維性組織の増生、マクロファージの浸潤、血管新生が認められ、破骨細胞浸潤、細胞残屑、出血などが散見された。また膝蓋骨では軟骨組織の肥厚および軟骨表面の微細な剥がれあるいは小繊維形成が散見された。しかし、いずれの変化も両群間に差異は認められなかった。血液学検査では、被験物質埋植群において、血小板数に有意な増加が認められたが、被験物質埋植との関連は明らかではなかった。その他の検査項目では、対照物質埋植群と被験物質埋植群との間に有意差および所見の差異はなく、対照物質埋食と比較して被験物質埋植による影響を示唆するような変化も観察されなかった。以上の結果から、本試験条件下において、被験物質 MPC 処理 UHMWPE は、対照物質 UHMWPE と比較して全身および埋植部位に対する影響に差がないと考えられ、対照物質と同程度の安全性が確認された。MPC 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、特に人工股関節置換術において、術後約 10～15 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超高分子量ポリエチレン (Ultra high molecular weight polyethylene : UHMWPE) 表面を創製し (以下 MPC 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 処理 UHMWPE の著しい低摩耗を確認した。

MPC 処理 UHMWPE の構成成分のうち、基材である UHMWPE は従来製品に用いられており、多くの臨床成績によりその安全性が確認されている。MPC ポリマーは、既承認製品 (医療機器承認番号 20300BZZ00402000、販売名 : 滅菌済み血管処置用チューブ及びカテーテル インタースルー、株式会社クリニカル・サプライ)、米国 Food and Drug Administration において既に承認されている心臓血管ガイドワイヤー製品 (FDA K970938、Soft Guide Wire with PC Coating、1997)、コンタクトレンズ製品 (FDA K974408、Proclear Compatibles Soft Contact lens、1998)、耳インプラント製品 (FDA K000801、PC Coated Fluoroplastic Ventilation Tubes、2000) に使用されているコーティング材 (MPC コポリマー) を構成する成分と等しい材料 (MPC モノマー) を使用している。

処理助剤 (紫外線重合における増感剤) として使用しているベンゾフェノンについては、1 製品当たりを使用さ

れる量は約  $0.4 \mu\text{g}$  であり、文献等で報告されている有害性、例えば急性毒性 ; 腹腔内-マウス  $\text{LD}_{50} = 727 \text{ mg/kg}$  を用いヒトの体重を  $60 \text{ kg}$  として算出した約  $43.6 \text{ g}$  に比較して極めて少量である。また、紫外線重合後の洗浄工程において除去されるため、MPC 処理 UHMWPE 内に検出することはできない (検出限界以下)。以上より、MPC 処理 UHMWPE を構成する成分について、生物学的安全性が確認できると考えた。

以上を踏まえ、クラス III に分類される植込み型機器である MPC 処理 UHMWPE の生物学的安全性については、「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令の施行について」 (平成 17 年 3 月 31 日、薬食発第 0331038 号) を遵守し、「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について」 (平成 15 年 2 月 13 日、医薬審発第 0213001 号)、「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」 (平成 15 年 3 月 19 日、医療機器審査 No. 36、以下、医療機器審査 No. 36 と記す)、及び「Biological Evaluation of Medical Devices- Part 1: Evaluation and Testing」 (ISO 10993-1、August 1、2003) に準拠して、細胞毒性、皮膚感作性、遺伝毒性、骨内埋植、及び亜慢性毒性を実施することが必要と考えられた。

これまでの研究により、MPC 処理 UHMWPE の生物学的安全性について、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、V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験、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ない、いずれの試験結果も陰性であることを確認した。

本研究では、更に、MPC 処理した UHMWPE の基礎的な生物学的安全性を調べる目的で、ウサギを用いた 90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験を行った。なお、本試験は、医療機器審査 No. 36 に準拠し、「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成 17 年 3 月 23 日、厚生労働省令第 37 号）および「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令の施行について」（平成 17 年 3 月 31 日、薬食発第 0331038 号）を遵守して実施したものである。

## B. 研究方法

MPC 処理 UHMWPE (CLPE) 被験体として、ウサギを用いた 90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験を実施した。板状の被験体及び対照試料の UHMWPE を左右膝関節軟骨内に埋植し、一般状態観察、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理組織学的検査等を実施した。

### 1. 被検物質 (MPC 処理 UHMWPE)

UHMWPE (GUR1020 レジン、分子量：約 350 万、純度：99.0%) の平板 (4 mm × 10 mm × 2 mm) を基材とし、その片側 (摺動) 表面を MPC 処理した。MPC 処理後、窒素ガス雰囲気下にて、ガンマ線滅菌を施した。

なお、被検物質の安定性については、GLP 基準による確認はされていないが、ガンマ線滅菌直後の被検物質およびガンマ線滅菌後、窒素ガス封入アルミ包装状態にて、約 3 ヶ月間、室温にて保管した被検物質についてのフーリエ変換赤外分光分析による評価を行

い、化学的安定性について確認したところ、変化が認められなかったことに基づき、本実験期間中安定であり、試験結果の信頼性に影響しないと判断した。

### 2. 対照材料

陰性材料として、UHMWPE (GUR1020 レジン、分子量：約 350 万、純度：99.0%) の平板 (4 mm × 10 mm × 2 mm) を窒素ガス雰囲気下にてガンマ線滅菌したのち試験に用いた。取り扱い等については、被験物質であると同様とした。

### 3. 使用動物および飼育方法

17 から 20 週齢の日本白色種ウサギ (Kbs: JW、クリーン動物、北山ラベス、伊那生産所) 21 匹を使用した。なお、入荷時の体重は 3.286 kg から 3.776 kg (平均 3.525 kg)、埋植時の体重は 3.385 kg から 3.803 kg (平均 3.603 kg) であった。

動物は、許容温度 20.0 から 26.0°C、許容湿度 40.0 から 75.0%、換気回数 15 回/時、照明 12 時間 (7 時～19 時) に制御された飼育室内で、金属性金網床ケージ (350W × 500D × 350H mm) に 1 匹ずつ収容し、固形飼料 (RC4、オリエンタル酵母工業) の制限給餌 (1 日あたり約 130 g) および水道水の自由摂取により飼育した。

### 4. 埋植方法

臨床適用部位が関節腔内であるため、被験物質 (MPC 処理 UHMWPE) が膝関節液に接するように大腿骨の膝関節面を埋植部位として選択し、左右の膝関節軟骨に、被験物質の 10 mm × 4 mm の 1 面が関節面となるように埋植

した。埋植量は、医療機器審査 No. 36 (第4部埋植試験)に記載されている1匹あたりの埋植量に相当する表面積が得られるような大きさを想定した場合、関節面に埋植するには大き過ぎるため、埋植可能な最大量である10W × 4D × 2H mmを埋植量として選択した。また、被験物質は、膝蓋骨への機械的刺激を防ぐため、10W × 4D mmの面にある辺のうち、4 mmの短辺の一方を面取りした。埋植期間は、医療機器審査 No. 36 (第6部全身毒性)に従って90日間とし、埋植第90日(埋植日 = 埋植第1日)を埋植期間終了日とした。埋植手順を以下に示す。

#### 1) 麻酔および前処置

動物を麻酔するためにセラクター 2 g 注射液および動物用ケタラール 50 を 1:4 の割合で混合して混合麻酔液を調製し、約 1 mL/kg の容量で、動物の大腿部筋肉内へ注射した。麻酔後、電気バリカン(TN小動物電気バリカン 900 型、夏目製作所)を用いて術部の剪毛を行った。

#### 2) 被験物質の埋植

手術台に動物を乗せ、術部皮膚をイソジンおよびアルコール綿で消毒した。麻酔深度が手術適期であることを確認したのち、先に手術を行う側の膝部内側の皮膚を約 5 cm 切開した。膝を伸展した状態で膝蓋骨を外側に脱臼させ、関節包を切開した後、膝を屈曲させて大腿骨の関節軟骨を露出させた。NRK ミニター(日本理化学器械)

を用いて膝蓋溝中央に埋植試料が埋植できるような 10W × 4D × 2H mm 位の欠損を作製した。なお、欠損部の作製中は、生理食塩水を適時滴下し、術部の冷却および洗浄を行った。目的とする大きさの欠損部が出来上がったのち、再び、埋植部位である軟骨欠損部を生理食塩液で洗浄した。被験物質を包装されている袋から衛生的に取り出し、滅菌生理食塩液で洗浄した後、短辺が面取りされている面が関節腔に接するように試料を欠損部に埋植した。埋植部を覆うように膝蓋骨を整復し、手術部位周辺を生理食塩液で洗浄した。

#### 3) 縫合

関節包を縫合糸で縫合し、切開部皮膚を手術用ワイヤーで縫合した。術部をイソジンおよびアルコール綿で消毒した。反対側の膝関節についても前記 1) から 3) の方法で試料を埋植した後、術部に負担をかけないように注意しながら、ウサギを飼育ケージに戻した。

#### 5. 観察および検査

##### 1) 一般状態の観察

毎月1回(埋植日は埋植前および埋植後の2回)、全例の生死を含む一般状態を観察した。

##### 2) 体重測定

埋植第1週は埋植第1日の埋植前、第2週以降は毎週1回の頻度でそれぞれ週の第1日に全例の体重を測定した。また、埋植期間終了日および器官重量の比体重値算出用に剖検日にも

体重を測定した。

### 3) 摂餌量測定

埋植第1週では、埋植第1日から第2日にかけて全例の1日あたりの摂餌量を測定し、以後埋植期間中毎週1回の頻度で、それぞれの週の第1日から第2日にかけての摂餌量を測定した。

### 4) 採血

採血前に全例を約18.5から19.5時間（予備飼育期間中は約18.5から22.5時間）絶食させた。その後、耳静脈から血液学的検査用①（抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを処理した注射筒で採血）、血液学的検査用②（抗凝固剤としてEDTA-2Kを処理した注射筒で採血）、血液生化学的検査用（抗凝固剤としてヘパリンを処理した注射筒で採血）の順序で採血した。

### 5) 血液学的検査

採取した血液学的検査用②の血液について、血液自動分析装置CELL-DYN3500（アボットジャパン）を用いて、電気抵抗法により赤血球数、平均赤血球容積および血小板数、フローサイトメトリー・レーザー光散乱法／電気抵抗法により白血球数、吸光度法によりヘモグロビン量を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。白血球分類は、Wright-Giemsa染色を施した血塗抹標本を、光学顕微鏡を用いて視算することにより求めた。また、血液学的検査用①の血液から血漿を分離し、全自動血液凝固測定装置CA-1000（シスメックス）を用いて、光散乱検出法によりプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間を測定した。

### 6) 血液生化学的検査

採取した血液生化学的検査用血液から血漿を分離し、生化学自動分析装置COBAS MIRA plus（ロシュ・ダイアグノスティクス）を用いて、ビウレット法により総蛋白濃度、BCG法によりアルブミン濃度、コレステロールオキシダーゼ・HDAOS法により総コレステロール濃度、GPO・HDAOS（グリセリン消去）法によりトリグリセライド濃度、コリンオキシターゼ・DAOS法によりリン脂質濃度、ヘキソキナーゼ・G-6-PDH法によりグルコース濃度、ウレアーゼ・GIDH法により尿素窒素濃度、jaffe法によりクレアチニン濃度、GSCC法によりアルカリフォスファターゼ（ALP）活性、IFCC法によりアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST（GOT））活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT（GPT））活性および $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチターゼ（ $\gamma$ -GTP）活性、モリブデン酸直接法により無機リン濃度、Wroblewski-La Due法により乳酸脱水素酵素（LDH）活性、OCPC法によりカルシウム濃度を測定し、アルブミン／グロブリン（A/G）比を算出した。また、全自動電解質分析装置EA05（エーアンドティ）を用いたイオン電極法によりナトリウムイオン濃度、カリウムイオン濃度および塩素イオン濃度を測定した。

### 7) 病理学的検査

定期解剖例全例について、前記4)項の採血後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させてから剖検し、器官および組織の肉眼的観察を実施した。その際、膝関節内側の関節包を切開して埋植部位を観察した。また、各動物の脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、および精巣の重量（実重

量)を測定したほか、各器官の重量を剖検日の体重で除して比体重値(相対重量)を算出した。また、全例について、肉眼的観察および器官重量測定に引き続き、脳、下垂体、甲状腺および上皮小体、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、精巣、精巣上体、膀胱、精囊、前立腺、骨髄および大腿骨、埋植部、脛骨近位端、膝蓋骨および関節包の一部を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し、眼球をホルマリン・グルタルアルデヒド混合液に固定した。なお、すべての器官および組織の長期保存には0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を選択した。

さらに、心臓、肝臓、腎臓、脾臓および副腎、ならびに脱灰した埋植部、脛骨近位端、膝蓋骨および関節包の一部を取り出してパラフィン包埋ブロックを作製し、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した(図1)。この染色標本について光学顕微鏡を用いて病理組織学的に検査した。

## 6. データの解析

有意差検定の有意水準は5%として、以下に示す方法でデータの統計解析を行った。

### 1) 定量的検査値

体重、摂餌量、定期解剖例の血液学的検査および血液生化学的検査ならびに器官重量の各測定値については、群毎に平均値および標準偏差を求めた。次いで、F-検定を行い、等分散の場合はStudentの $t$ 検定、不等分散の場合にはAspin-Welchの $t$ 検定を行い、対照物質埋植群と被験物質埋植群との平均値の差を検定した。但し、どちらかの群で分散が0となった場合、 $t$ 検定は実施しなかった。

### 2) 病理組織所見

グレード分けしたデータはMann-Whitneyの $U$ 検定により、また陽性グレードの合計値はFisherの直

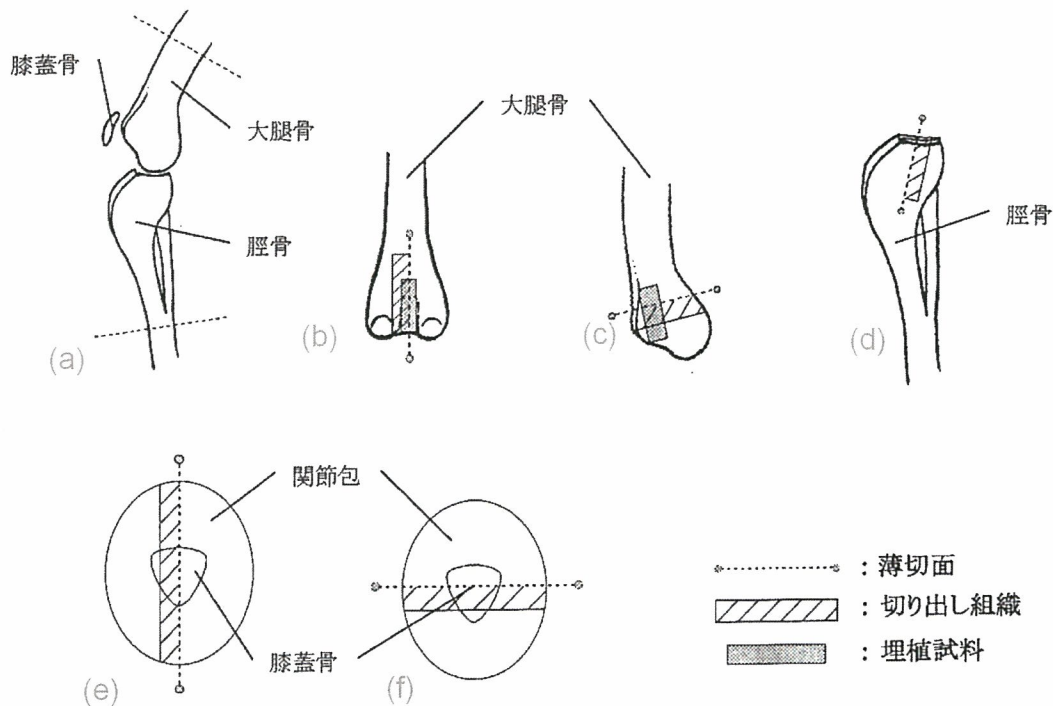


図1 埋植部、脛骨近位端、膝蓋骨および関節包付近のパラフィン包埋ブロック作製部位

接確率の片側検定により、対照物質埋植群と被験物質埋植群との間の有意差検定を行った。

### 3) データの棄却について

動物番号4の右膝関節で、切り出し時に対照物質の脱落が認められた。また、動物番号14の左膝関節では、剖検時に被験物質が埋植部位より外れて膝関節内にあることが確認された。動物番号4および14とも埋植部位から対照物質または被験物質が外れており、埋植部位の状態を評価できないため、外れていた側の埋植部位の検査結果は病理組織学検査の統計対象から除外することとした。

## C. 研究結果

### 1. 一般状態

表1に、埋植したウサギ（90日間）のクリニカルサインを示す。被験物質（MPC処理UHMWPE）埋植群の1例で埋植第15日から、対照物質埋植（UHMWPE）群の1例で埋植第21日か

ら、片側の埋植部位において埋植手術部周囲皮膚の発赤および潰瘍が観察された。これら発赤および潰瘍は、被験物質埋植群の1例では、埋植第20日に回復が確認され、対照物質埋植群では、発赤消失、痂皮への移行を経て埋植第35日に回復が確認された。この他、埋植第2日（埋植日翌日）から埋植第4日にかけて全例で給餌した餌の食べ残しがみられたが、その後、残餌の頻度は減少し、埋植第28日までには、対照物質埋植群の3例を除き、残餌は認められなくなった。対照物質埋植群の1例では、埋植期間を通して散発的に残餌が認められ、排便量の減少を伴うこともあった。また、対照物質埋植群の別の2例では、埋植第59日または第65日に残餌が認められた。このほかにはどちらの群でも一般状態の変化は観察されなかった。

表1 MPC処理UHMWPEを埋植したウサギ（90日間）のクリニカルサイン

Clinical signs	Number <sup>a)</sup> of Group animals	Number of animals with clinical signs														Total
		Day of the experimental period														
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	50-56	57-63	64-70	71-77	78-84	85-90		
Ulcer/crust on the skin at area implanted																
PE	7	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
MPC-PE	8	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Reddening of skin at area implanted																
PE	7	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
MPC-PE	8	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Not finish supplied food																
PE	7	7	6	6	6	1	1	-	1	2	2	1	1	1	7	
MPC-PE	8	8	7	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	
Decrease in fecal volume																
PE	7	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	1	
MPC-PE	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

## 2. 体重

埋植期間を通して対照物質 (UHMWPE) 埋植群と被験物質 (MPC 処理 UHMWPE) 埋植群との間に有意な増減は認められなかった。

## 3. 摂餌量

図 2 に、MPC 処理 UHMWPE を埋植したウサギ (90 日間) の摂餌量を示す。埋植第 8 日から 9 日にかけて測定した 1 日あたりの摂餌量が、被験物質 (MPC 処理 UHMWPE) 埋植群で対照物質 (UHMWPE) 埋植群と比較して有意に高値となった。この他には埋植期間を通して対照物質埋植群と被験物質埋植群との間に有意差は見られなかった。

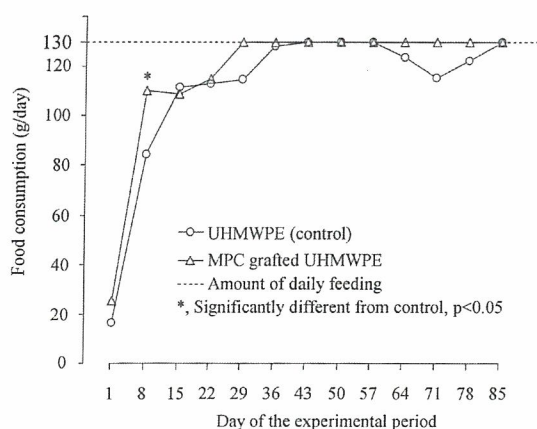


図 2 MPC 処理 UHMWPE を埋植したウサギ (90 日間) の摂餌量

## 4. 血液学的検査

被験物質 (MPC 処理 UHMWPE) 埋植群において、血小板数が有意に増加した。この他に対照物質 (UHMWPE) 埋植群と被験物質埋植群との間で有意な変化はなかった (表 2)。

## 5. 血液生化学的検査

表 3 に MPC 処理 UHMWPE を埋植したウサギ (90 日間後) の血液生化学的検査の結果をまとめる。被験物質 (MPC 処理 UHMWPE) 埋植群において、尿素窒素濃度およびクレアチニン濃度が有意に増加した。この他に対照物質 (UHMWPE) 埋植群と被験物質埋植群との間で有意な変化はなかった。

## 6. 病理学的検査

### 1) 器官重量

表 4 および 5 に、各動物の脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、および精巣の重量 (実重量値および比体重値) を示す。被験物質埋植群において、肺の実重量が有意に増加したが、この他に実重量および比体重値とも対照物質埋植群と比較して有意な増減は示さなかった。

### 2) 剖検所見

剖検時、膝関節内側の関節包を切開して埋植部位を観察した際、被験物質埋植 (MPC 処理 UHMWPE) 群の 1 例 (動物番号: 14、左膝関節) において、埋植試料の関節腔内への脱落が認められた。また、切り出し時、対照物質 (UHMWPE) 埋植群の 1 例 (動物番号: 4、右膝関節) では、埋植物質が脱落し、埋植試料は確認できなかった。各動物において、その他の器官・組織に肉眼的変化は認められなかった。



表 2 MPC 処理 UHMWPE を埋植したウサギ (90 日間後) の血液学的検査結果

Group	Number of animals	RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (x10 <sup>4</sup> /μL)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	695 ±36	15.7 ±0.9	45.4 ±2.6	65.3 ±2.5	22.6 ±1.0	34.6 ±0.5	27.0 ±3.3
MPC grafted UHMWPE	8	709 ±44	15.7 ±1.0	45.5 ±3.3	64.2 ±1.9	22.1 ±0.6	34.5 ±0.2	32.1 ** ±3.0

Group	Number of animals	WBC (x100/μL)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	58.3 ±10.3	36 ±13	1 ±1	3 ±3	8 ±3	52 ±13
MPC grafted UHMWPE	8	61.2 ±11.5	29 ±7	2 ±1	5 ±2	6 ±3	59 ±7

Group	Number of animals	PT (sec)	APTT (sec)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	4.4 ±0.1	14.6 ±1.5
MPC grafted UHMWPE	8	4.5 ±0.1	15.1 ±1.3

a), Data of animal number 4 were excluded from statistical analyses because the implanted material was not detected in the right articular cavity at the necropsy. Parameter, mean ±S.D.

\*\* , Significantly different from control, p<0.01

表 3 MPC 処理 UHMWPE を埋植したウサギ (90 日間後) の血液生化学的検査結果

Group	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri-glyceride (mg/dL)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	6.5 ±0.2	4.6 ±0.2	2.46 ±0.46	19 ±3	1.4 ±0.1	125 ±9	18 ±6	21 ±8
MPC grafted UHMWPE	8	6.5 ±0.3	4.6 ±0.3	2.40 ±0.60	23 * ±3	1.6 * ±0.1	125 ±14	21 ±4	17 ±3

Group	Number of animals	Phospho-lipid (mg/dL)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	γ -GTP (U/L)	Inorganic phosphorus (mg/dL)	Calcium (mg/dL)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	50 ±12	43 ±15	44 ±16	38 ±12	90 ±27	5 ±1	3.8 ±0.6	12.7 ±0.6
MPC grafted UHMWPE	8	52 ±6	60 ±18	72 ±68	55 ±30	88 ±19	6 ±2	4.1 ±0.7	13.1 ±0.3

Group	Number of animals	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	142.1 ±2.1	4.05 ±0.37	107.5 ±1.3
MPC grafted UHMWPE	8	144.0 ±2.4	4.07 ±0.16	108.1 ±1.2

表 4 各動物の脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、および精巣の実重量値

Group	Number of animals	Body weight (kg)	Brain (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)	Testes (g)	Adrenal glands (mg)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	3.570 ±0.256	10.29 ±0.63	9.12 ±0.72	65.83 ±11.00	15.78 ±2.22	1.13 ±0.29	6.23 ±0.80	429 ±95
MPC grafted UHMWPE	8	3.708 ±0.125	10.14 ±0.52	10.05 * ±0.72	63.65 ±4.32	14.98 ±1.48	1.16 ±0.13	5.73 ±1.67	423 ±83

a), Data of animal number 4 were excluded from statistical analyses because the implanted material was not detected in the right articular cavity at the necropsy.

Parameter, mean ±S.D.

\*, Significantly different from control, p<0.05

表 5 各動物の脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、および精巣の比体重値

Group	Number of animals	Body weight (kg)	Brain (g/kg)	Lung (g/kg)	Liver (g/kg)	Kidneys (g/kg)	Spleen (g/kg)	Testes (g/kg)	Adrenal glands (mg/kg)
UHMWPE (control)	7 <sup>a)</sup>	3.570 ±0.256	2.897 ±0.303	2.558 ±0.175	18.359 ±2.056	4.411 ±0.451	0.318 ±0.075	1.750 ±0.252	120.931 ±28.479
MPC grafted UHMWPE	8	3.708 ±0.125	2.739 ±0.211	2.714 ±0.220	17.164 ±0.991	4.038 ±0.347	0.313 ±0.033	1.548 ±0.468	114.205 ±22.783

a), Data of animal number 4 were excluded from statistical analyses because the implanted material was not detected in the right articular cavity at the necropsy.

Parameter, mean ±S.D.

### 3) 組織学検査所見

#### ① 膝関節埋植部

図 3~6 に、試料埋植部大腿骨軟骨の組織写真を示す。図 7~10 に、試料埋植部膝蓋骨軟骨の組織写真を示す。

埋植部大腿骨の埋植試料と接する部位において、対照物質 (UHMWPE) 埋植群を含む被験物質 (MPC 処理 UHMWPE) 埋植群のほとんどの例でマクロファージの浸潤のほか軟骨芽細胞、骨芽細胞、軟骨組織、骨組織および線維性組織の増生、血管新生が認められた (図 3~6)。これらはごく軽度から中等度の変化を示したが、両群間の発生頻度および程度に有意差は認められなかった。その他、対照物質埋植群 4 例の 4 埋植部位、被験物質埋植群 2 例の 2 埋植部位に破骨細胞浸潤、対照物質埋植群 5 例の 7 埋植部位、被験物

質埋植群 4 例の 6 埋植部位で細胞残屑、対照物質埋植群 6 例の 7 埋植部位、被験物質埋植群 3 例の 3 埋植部位で出血、被験物質埋植群 1 例の 1 埋植部位に褐色色素沈着がいずれもごく軽度の変化として認めら (図 3~6)、両群間の発生頻度および程度になかった。

膝蓋骨では、対照物質埋植群 5 例の 5 埋植部位、被験物質埋植群の 3 例の 3 埋植部位の軟骨組織に肥厚がみられた。また、対照物質埋植群 4 例の 7 埋植部位、被験物質埋植群の 5 例の 7 埋植部位の軟骨表面では、微細な剥がれあるいは小線維形成 (flaking and/or fibrillation) が認められたが (図 7)、両群間の発生頻度および程度に有意な差はなかった。滑膜を含む関節包 (図 8) および脛骨近位端 (図 9) には両群とも変化は認められなかった。

埋植物質の脱落が認められた2例では、  
いずれの欠損部も軟骨芽細胞および  
骨芽細胞の増生を伴う軟骨組織ある  
いは骨組織で埋められていた(図10)。

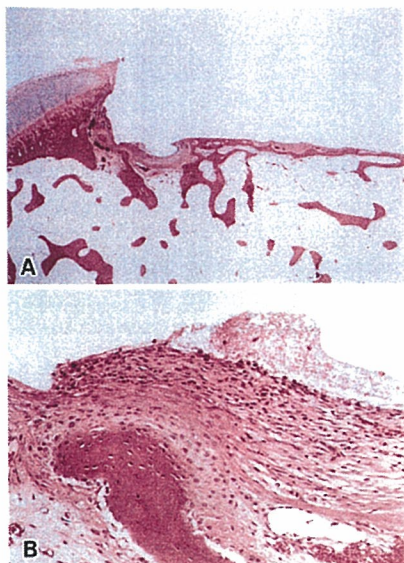


図3 試料 (UHMWPE) 埋植部大腿骨軟骨の組織  
写真-1 (A: 34x, B: 170x)

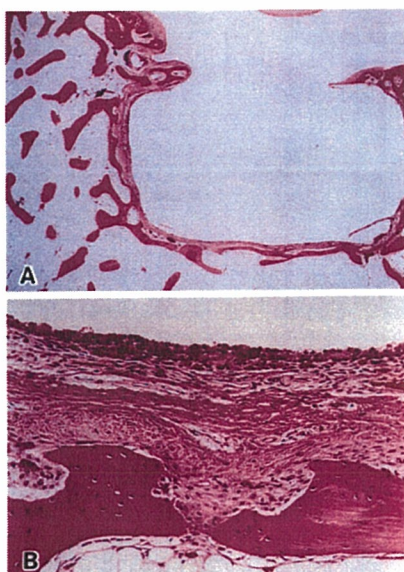


図4 試料 (UHMWPE) 埋植部大腿骨軟骨の組織  
写真-2 (A: 17x, B: 170x)

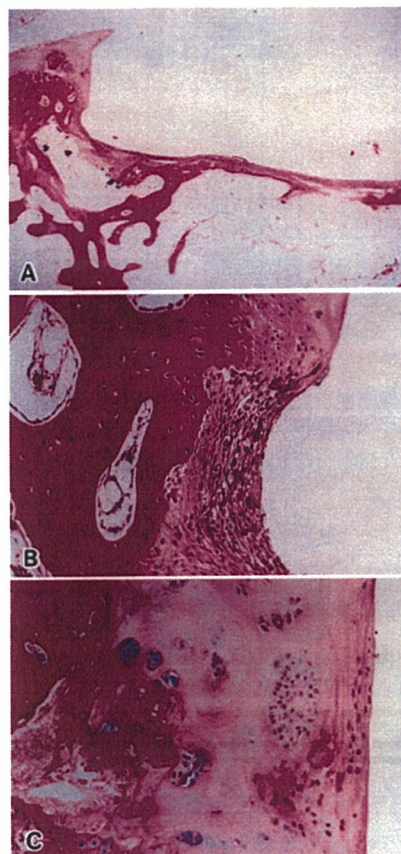


図5 試料 (MPC 処理 UHMWPE) 埋植部大腿骨軟  
骨の組織写真-3 (A: 17x, B: 170x, C:  
170x)

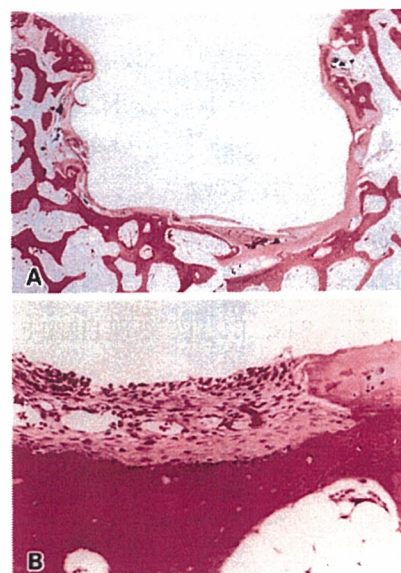


図6 試料 (MPC 処理 UHMWPE) 埋植部大腿骨軟  
骨の組織写真-4 (A: 17x, B: 170x)

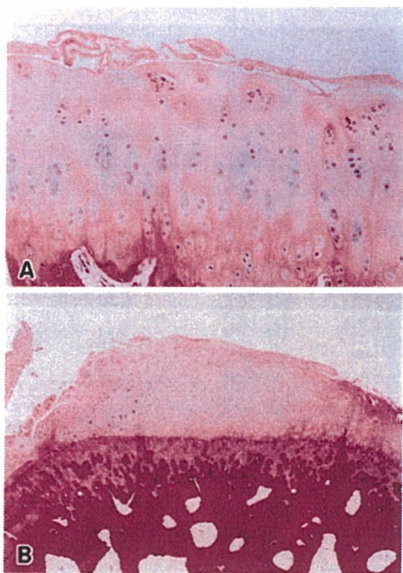


図 7 埋植部膝蓋骨軟骨の組織写真-1 (A: UHMWPE, 170x, B: MPC 処理 UHMWPE, 34x)

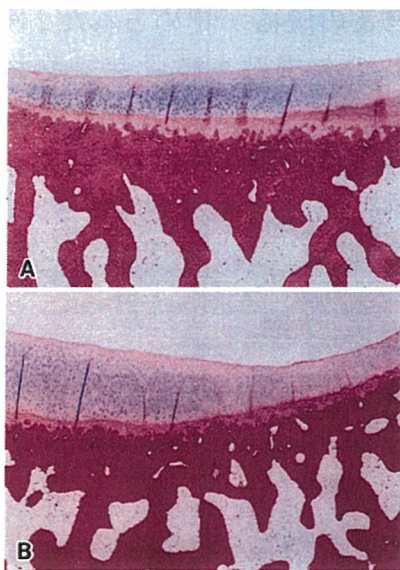


図 9 埋植部膝蓋骨軟骨の組織写真-3 (A: UHMWPE, 34x, B: MPC 処理 UHMWPE, 34x)

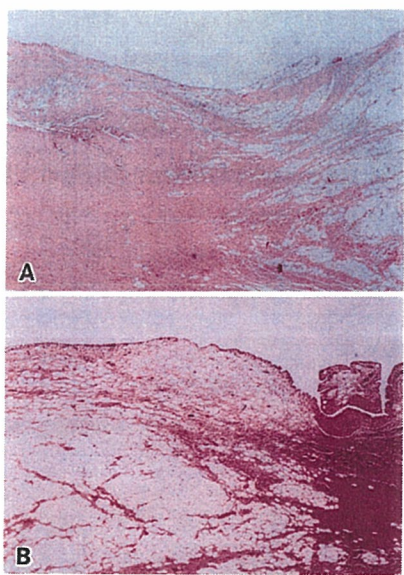


図 8 埋植部膝蓋骨軟骨の組織写真-2 (A: UHMWPE, 34x, B: MPC 処理 UHMWPE, 34x)

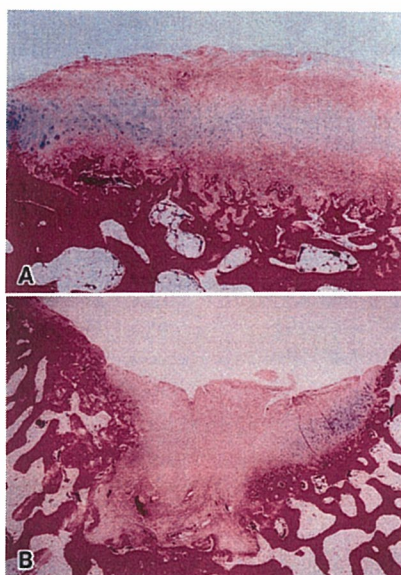


図 10 埋植部膝蓋骨軟骨の組織写真-4 (A: UHMWPE, 170x, B: MPC 処理 UHMWPE, 85x)

## ②埋植部位以外の器官および組織

組織学的検査を行った心臓、肝臓、腎臓、脾臓および副腎について以下に示す(表6)。

心臓では、対照物質(UHMWPE)埋植