

- 5) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Takadama H, Yamawaki N, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Enhanced wear resistance of modified cross-linked polyethylene by grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine). *J Biomed Mater Res A* 82: 10-17, 2007.
- 6) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Konno T, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Enhanced wear resistance of orthopaedic bearing due to the cross-linking of poly(MPC) graft chains induced by gamma-ray irradiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 84: 320-327, 2008.
- 7) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Effect of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine concentration on photo-induced graft polymerization of polyethylene in reducing the wear of orthopaedic bearing surface. *J Biomed Mater Res A*, in press.
- 8) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Effects of mobility/immobility of surface modification by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on the durability of polyethylene for artificial joints. *J Biomed Mater Res A*, in press.
- 9) Kyomoto M, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Super-lubricious surface mimicking articular cartilage by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on orthopaedic metal bearings. *J Biomed Mater Res A*, in contribution.
- 10) Liu G, Ogasawara T, Watanabe J, Ishihara K, Asawa Y, Chung UI, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K: Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A*, in contribution.
- 2.学会発表
- ① 国内学会
- 1) 石山典幸、茂呂徹、大江隆史、三浦俊樹、川口浩: 生体適合性ポリマーゲルのニワトリ腱損傷モデルにおける癒着防止効果. *第50回日本手の外科学会学術集会*. 山形, 2007.4.19-20
- 2) 高取吉雄, 茂呂徹, 山本基, 荻田達郎, 伊藤英也, 京本政之, 川口浩, 中村耕三: シンポジウム「各部位の人工関節の耐久性と問題点」未来に向けて何年もたせるか人工股関節の耐久性と MPC 処理. *第51回日本リウマチ学会*. 横浜, 4.26-29, 2007.
- 3) 石山典幸、茂呂徹、中村耕三、川口浩: 術後癒着防止効果を有する生体内解離性ゲル. *第51回日本リウマチ学会*. 横浜, 4.26-29, 2007.
- 4) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 金野智浩, 京本政之, 山脇昇, 山本基, 荻田達郎, 中村耕三, 川口浩: ポリエチレン表面のMPCグラフト処理による長寿命型人工関節の開発ー処理密度の制御と耐摩耗効果ー. *第80回日本整形外科学会学術総会*.

- 神戸, 5.24-27, 2007.
- 5) 茂呂徹: 関節摺動面の MPC 処理による人工股関節の耐久性の向上. **トライボロジー会議 2007 秋 佐賀. 佐賀, 9.27, 2007.**
 - 6) 茂呂徹: 関節摺動面のナノ処理による新しい人工股関節の開発. **第 13 回人工関節基礎研究会. 東京, 9.29, 2007.**
 - 7) 茂呂徹: 耐摩耗性を高めた新しい人工関節の開発. **茨城整形外科講演会. 水戸, 10.25, 2007.**
 - 8) 京本政之, 岩崎泰彦, 茂呂徹, 宮路史明, 金野智浩, 川口浩, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦: 長寿命人工関節のためのリン脂質グラフトポリマーによる高潤滑性 Co-Cr-Mo 合金の創製. **第 29 回日本バイオマテリアル学会. 大阪, 11.26-27, 2007.**
 - 9) 石山典幸, 茂呂徹, 三浦俊樹, 大江隆史, 伊藤祥三, 金野智浩, 吉河美都奈, 大山但, 中村耕三, 川口浩, 石原一彦: 生体内解離性リン脂質ポリマーハイドロゲルによる組織癒着防止材の開発. **第 29 回日本バイオマテリアル学会大会. 大阪, 11.26-27, 2007.**
 - 10) 茂呂徹: オーガナイズドセッション「ナノメディシン—研究と人材育成—」ナノ表面処理による新しい人工関節の開発. **第 51 回日本学術会議材料工学連合講演会. 京都, 11.27-29, 2007.**
 - 11) 京本政之, 茂呂徹, 宮路史明, 上野勝, 橋本雅美, 川口浩, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦: 高密度生体適合性リン脂質ポリマー表面による長寿命型人工関節. **第 34 回日本臨床バイオメカニクス学会. 東京, 12.7-8, 2007.**
 - 12) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 山本基, 荻田達郎, 伊藤英也, 中村耕三, 川口浩: シンポジウム「人工股関節の開発課題とバイオメカニクス」長寿命型人工股関節の開発—生体適合性ポリマーによるポリエチレンライナーのナノ表面処理—. **第 34 回日本臨床バイオメカニクス学会. 東京, 12.7-8, 2007.**
 - 13) 荻田達郎, 高取吉雄, 山本基, 茂呂徹, 馬淵昭彦, 伊藤英也, 齊藤貴志: 人工股関節においてジルコニア骨頭を架橋ポリエチレンと組み合わせた場合の線摩耗率. **第 34 回日本臨床バイオメカニクス学会. 東京, 12.7-8, 2007.**
 - 14) 高取吉雄, 茂呂徹, 山本基, 荻田達郎, 伊藤英也, 齊藤貴志, 京本政之, 川口浩, 中村耕三: 耐久性に優れた人工股関節の開発—ポリエチレン・ライナーの MPC 処理. **第 38 回日本人工関節学会. 沖縄, 2.29, 2008.**
 - 15) 京本政之, 茂呂徹, 宮路史明, 金野智浩, 川口浩, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦: 超耐久性高潤滑インターフェイスの構築による長寿命型人工関節. **第 56 回高分子討論会. 名古屋, 3.2-5, 2008.**
- ② 国際学会
- 1) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura

- K, Miyaji F, Ishihara K: High density grafting of nano-polymer makes ultra-longevity for artificial joints. ***The 2007 Society for Biomaterials Annual Meeting and Exposition (SFB)***. Chicago, USA, April 18-21, 2007.
- 2) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Nano-scale modification with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer brings to ultra-longevity for orthopaedic bearing. ***3rd UHMWPE International Meeting***. Madrid, Spain, September 14-15, 2007.
- 3) Ishiyama N, Moro T, Miura T, Ohe T, Nakamura K, Kawaguchi H, Nakamura K: Biodissociatable phospholipid polymer hydrogel prevents tendon adhesion without impairing. ***62nd annual meeting of the American Society for Surgery of the Hand (ASSH)***. Seattle, USA, September 27-29, 2007.
- 4) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Kyomoto M, Motoi Y, Karita T, Ito H, Nakamura K, Kawaguchi H: Advanced wear resistance of artificial hip joints by nano-scaled grafting with biocompatible phospholipid polymers. ***54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS)***. San Francisco, USA, March 2-5, 2008.
- 5) Kyomoto M, Moro T, Konno T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Miyaji F, Yamawaki N, Ishihara K: Advanced wear resistance of MPC grafted surface with various phosphate density on cross-linked polyethylene. ***54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS)***. San Francisco, USA, March 2-5, 2008.
- 6) Ishiyama N, Moro T, Miura T, Ohe T, Itoh S, Konno T, Yoshikawa M, Oyama T, Ishihara K, Nakamura K, Kawaguchi H: Biocompatible anti-adhesion effect of biodissociated phospholipid polymer hydrogel. ***54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS)***. San Francisco, USA, March 2-5, 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称: 「生体適合性および低摩擦性部材及びそれをを用いた人工関節並びにその製造方法」
- 発明者: 京本政之、石原一彦、中村耕三、川口浩、高取吉雄、茂呂徹
- 出願者: 日本メディカルマテリアル株式会社、東京大学
- 出願番号: 特願 2007-260191
- 出願日: 2007.10.3
2. 発明の名称: 「医療用具及びその製造方法」
- 発明者: 京本政之、石原一彦、中村耕三、川口浩、高取吉雄、茂呂徹
- 出願者: 日本メディカルマテリアル株式会社、東京大学
- 出願番号: 特願 2007-330917
- 出願日: 2007.12.21

分担研究報告書

人工関節金属表面のMPCポリマー処理に関する検討

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）
岩崎泰彦（関西大学 化学生命工学部 准教授）

研究要旨:金属製人工関節の摺動面の潤滑性、耐摩耗性を改善し長寿命化を図ることを本研究の目的とし、細胞膜に倣って合成された2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーによる人工関節用Cr-Co-Mo(CCM)合金の表面処理について検討したので報告する。過去、2年間には歯科矯正用接着性モノマーとしても利用されている4-メタクリロイルオキシエチルトリメリット酸無水物(4-META)を塗布したCCM合金をMPCと光重合開始剤を溶解した溶液に浸漬し、紫外光を照射することによりMPCポリマーの重合層を形成させた。これにより、金属表面の潤滑性を高めることに成功したが、表面修飾に斑が生じる技術的な課題も残されていた。今年度は、より均一性に富む表面修飾の実現を目指しシランカップリング剤を利用した新たな修飾法を検討した。3-メタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン(MPSi)を処理すると同時に、光重合開始剤をCCM表面に吸着させた。これをMPC水溶液に浸漬し、紫外光を照射した。この方法では表面よりMPCの重合が開始するためMPCポリマー鎖を高密度に修飾することができた。MPCポリマーを修飾することによりCCM表面の摩擦係数は格段に減少し、摩擦試験を繰り返し行なうことによって修飾安定性も確認された。

A. 研究目的

我々は生体膜表面の構造に着目して合成した2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーが、タンパク質の吸着や血液細胞の粘着や活性化を抑制し、優れた血液適合性を示すことを報告している。*(J Biomed Mater Res 1998, 39, 323. Anal Bioanal Chem 2005, 381, 534 など)*

また、MPCポリマーはポリウレタンやポリオレフィンの表面摩擦を低

減させるためにも有効であることも示されている。分担研究者の茂呂らは、人工股関節の超高分子量ポリエチレン製臼蓋部にMPCポリマーを修飾することにより、表面の耐摩耗性が著しく改善されることを明らかにした(*Nature Materials 2004, 3, 829*)。人工関節には高分子材料のみならず金属材料やセラミックスも利用されていることから、これらの表面をMPCポリマーで修飾する技術開発は長寿命型人工関節を実現するために極め

て重要な課題である。本研究では、人工関節に用いられているコバルトクロムモリブデン (Co-Cr-Mo、以下 CCM)合金の表面に MPC ポリマーを修飾するための新たな方法を見出すことを目的とし実施された。本年度は新たにトリメトキシシリル基を有するモノマーを利用し、MPC ポリマーの修飾を試みたので報告する。

B. 研究方法

金属表面の MPC ポリマー処理と表面解析

生体材料用 CCM 合金 (ASTM F75)を準備し、表面の凹凸が 0.01-0.02 μm になるよう研磨した。研磨後、不純物の除去と酸化被膜の形成のために 35vol%の硝酸に 35 分浸漬した。この処理は表面の Cr 組成を高める効果もある。硝酸処理した金属片を洗浄した後、速やかに 500W の酸素プラズマ処理を 5 分間行った。

上記の通り洗浄した金属試料を 5wt% 3-メタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン (MPSi)、1wt%コハク酸、0.1wt%イルガキュア (D2959)を含むエタノール溶液に 12 時間浸漬した。CCM 基板を取り出し、エタノールで洗浄した後、70°Cで 3 時間アニール処理した。

続いて MPC の水溶液 ($[\text{MPC}] = 0.25\text{--}1.00 \text{ mol/L}$) にシラン処理した CCM 基板を浸し、5mW/cm² の強度をもつ紫外線 (UVL-400: 理工科学産業、 $\lambda = 350 \pm 50 \text{ nm}$)を所定時間照射した。MPC による表面改質の反応スキームを図 1 に示す。照射後、基板をエタノールで洗浄し、未重合の MPC および遊離のポリマーを除去した。

MPC ポリマー処理した CCM 合金 (CCM-g-PMPC)の表面を全反射フーリエ変換赤外吸収スペクトル (ATR-FTIR、FT/IR615: JASCO)、

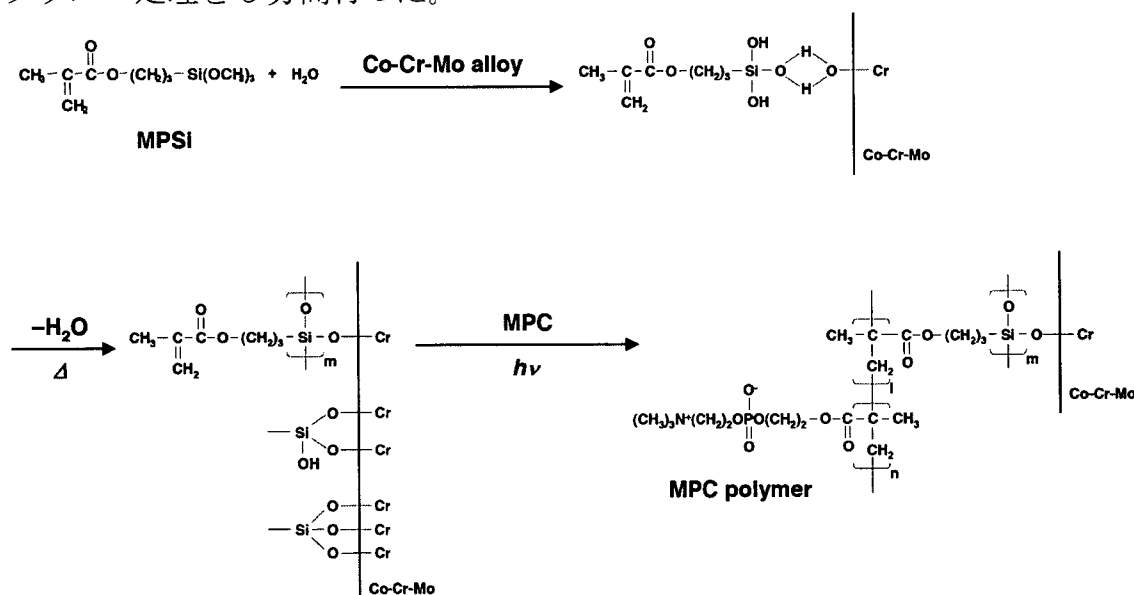


図 1 CCM 合金表面の修飾機構

接触角測定 (図 2)ならびに X 線光電子分光分析 (XPS、AXIS-HSi165: KRATOS、図 2)により解析した。

金属表面に修飾したポリマーの形状観察

CCM-g-PMPC 基板を所定の大きさに切削し、表面を Al 保護した後、Ga イオンビームを照射して断面を薄膜化 (FIB 加工)した。透過型電子顕微鏡 (TEM、FB-2000A:日立ハイテクノロジーズ)を用い、試料縦断面を観察した。

摩擦試験

CCM-g-PMPC 基板表面の摩擦試験は pin-on-plate 装置 (Tribostation 32: 新東科学)を用いて行った。評価には高さ直径 9 mm、高さ 5 mm のシリンダー状のピンを用いた。測定は純水中で行ない、0.98 N の荷重をかけながらピンを 1 Hz、25 mm の振り幅で最大 100 サイクル動かし行った。比較として、既報に従い MPC ポリマーを修飾した超高分子量ポリエチレンを用いた。

C. 研究結果

図 3 に MPC 濃度 0.5 M、紫外光照射時間 90 分間で処理した CCM-g-PMPC 基板の IR スペクトル結果を示す。未処理の CCM 基板では 800 から 2000 cm^{-1} まで特徴的な吸収は認められなかった。一方、MPC を光重合した表面では、MPC ユニットのカルボニル基 (C=O)、アルキル基 (-CH₂-)、リン酸エステル基 (-OP(=O)(-O)-O-)、アンモニウム基 (-N+(CH₃)₃)に由来する吸収が、1720、

1550、1240 (1080)、970 cm^{-1} にそれぞれ接触角測定

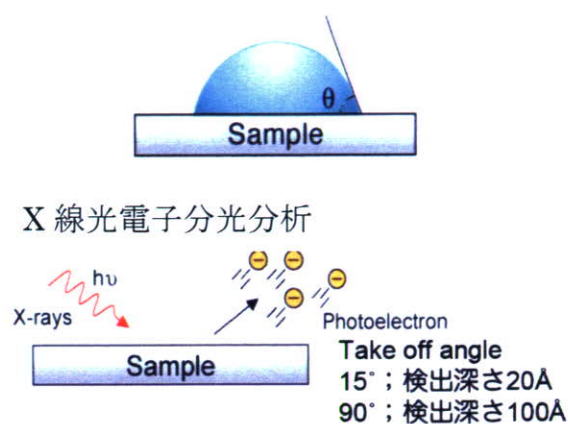


図 2 表面分析法

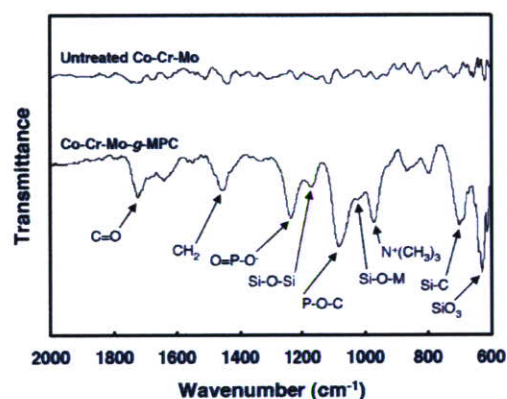


図 3 MPC 処理した CCM 合金表面の IR スペクトル

[MPC]=0.5mol/L, 光照射時間 90 分

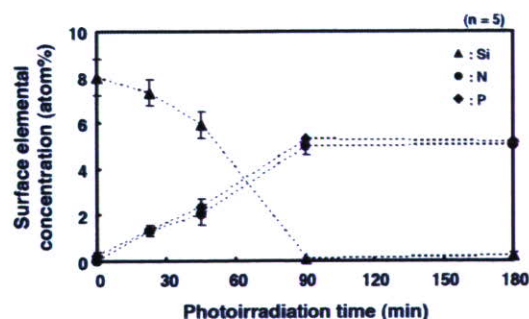


図 4 光照射時間と XPS 解析より求めた Si, N, P の組成比

[MPC]=0.5mol/L

れ認められた。

XPS 解析より求めた MPC 処理にともなう CCM 表面の化学組成変化を図 4 に示す。未処理の CCM 合金では、Si, N, P のいずれのシグナルも観察されなかった (データ省略)。MPSi をカップリングした表面では SiO_2 , Si_2O_3 に由来するスペクトルが 103eV に確認された。CCM-g-PMPC 基板表面では N, P のスペクトルが新たに確認され、重合時間が長くなるにつれ Si のシグナルは減少した。

図 5 に MPC 処理条件と CCM-g-PMPC 基板表面の接触角の値を示す。MPC の仕込み濃度ならびに紫外照射時間が長くなるにつれ、接触角の低下が認められた。また、CCM-g-PMPC 表面の接触角は約 20° で安定した。

CCM-g-PMPC (照射時間 90 分間)の縦断面 TEM 写真を図 6 に示す。MPC の仕込み濃度を増やすことにより、ポリマー相の厚さは増加した。1M で重合した時に約 190 nm のポリマー層が確認された。

図 7 に摩擦試験の結果を示す。試験機のピンに未処理の CCM 合金、架橋ポリエチレン (CLPE)、CLPE-g-PMPC (既報に従い調製)、ブタ関節より摘出した軟骨をそれぞれ使用した。一方、プレートには未処理の CCM 合金と MPC ポリマー処理した CCM 合金を用いた。CCM/CCM と CLPE/CCM の動的摩擦係数は初期の 10 サイクルではそれぞれ 0.19、0.14 と高い値を示し、特に CCM/CCM の摩擦係数はサイクル数とともに増加し、100 サイクルの段階で 0.41 を示した。試験後、試料表面を観察すると、摩擦痕がはっきりと認められた。

一方、CLPE-g-PMPC と未処理の CCM を用いた試験では、CLPE/CCM

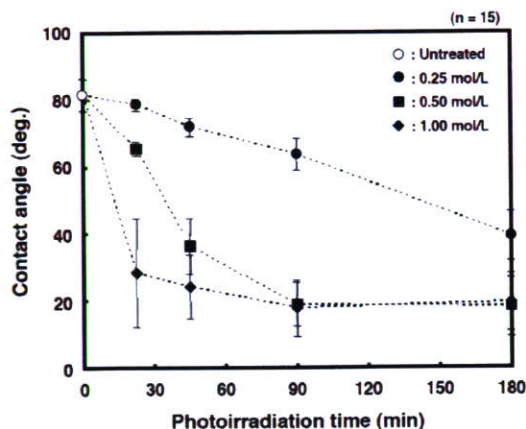


図 5 MPC の重合条件と表面の接触角

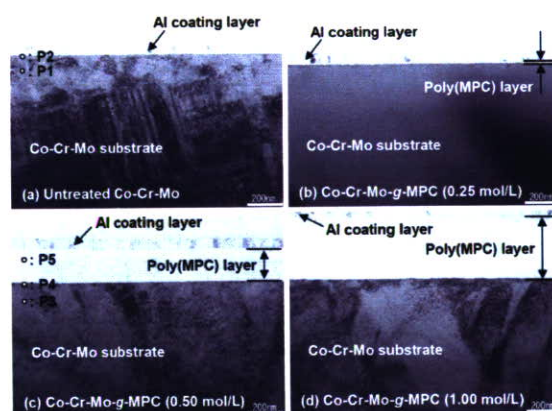


図 6 MPC 処理した CCM 合金の縦断面 TEM 像

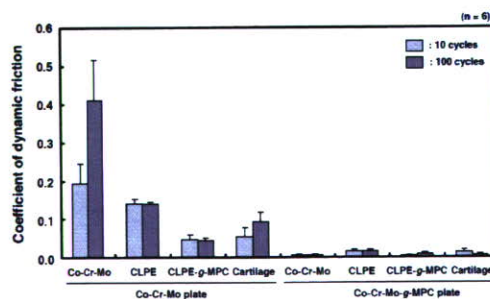


図 7 MPC 処理した CCM 合金の摩擦係数

に比べ70%程度摩擦が低下し、サイクル数に問わず0.05程度の低い摩擦係数を示した。CCM-g-PMPC/CCMの摩擦係数もCCM/CCMの摩擦係数に比べ著しく低下し、サイクル数が増しても摩擦の上昇は認められなかった。関節軟骨/CCM-MPCの摩擦係数は0.006と極めて低い値を示した。

D. 考察

本研究ではシラン修飾とMPCの表面グラフト重合の二段階処理によりCCMの表面摩擦を飛躍的に低減することに成功した。

MPSi処理により重合性基をCCM表面に導入した表面では接触角が 80° と比較的高い値を示したが、MPCをグラフトすることにより接触角は低下した。MPCの濃度や重合時間が増すにつれ接触角の低下は早まり、モノマー濃度によってグラフト表面のポリマー層の厚みも制御できた。シランの層に光重合開始剤が含新されているため、重合は基板表面から起こると考えられ、その結果、比較的高密度のMPCポリマー層が形成されていると思われる。XPSおよびTEMの結果からも比較的厚いMPCポリマー層で表面が完全に覆われていることも確認できた。

摩擦試験の結果から、未処理のCCMプレートに比べCCM-g-PMPCではいずれのピンを用いた場合でも著しく摩擦定数が低下した。またCCM-g-PMPCプレートでは試験のサイクル数、10回と100回の摩擦係数に有意な変化は認められず、表面処理が比較的で安定であることがわかった。この結果から、耐摩耗性にも優れていることが期待できる。

以前4-METAを用いた表面処理後のCCM基板とCLPE-g-PMPC

の摩擦係数とMPSiを使用した今回の結果を比べてみると、CLPE-g-PMPCに対する摩擦係数も飛躍的に低下した。本方法で調製したCCM上のMPCポリマー鎖のグラフト密度が前回の方法に比べ高く、また均一であることが理由として考えられる。

さらに特筆することは、関節軟骨とのCCM-g-PMPCの摩擦係数が0.006と低いことである。未処理のCCMと軟骨には0.1程度の摩擦係数が認められ、また文献値ではステンレス/軟骨が0.01-0.05、軟骨/軟骨が0.02と報告され、今回の結果はこれらの数値よりもはるかに低く、生体軟骨に対しても表面処理の効果が認められた。

E. 結論

本研究ではMPCポリマーによるCCM合金表面の新たな修飾法について検討した。その結果、従来の方法に比べMPCのグラフト密度を高めることに成功し、CCM-g-PMPCはポリマー、金属、生体軟骨、いずれの表面に対しても低い摩擦係数を示すことが明らかとなった。人工関節に有効な処理法であるか判断するためには、シミュレーターを用いた長期試験が必要となるが、本方法がこれまで検討された表面改質法に比べCCM表面の摩擦を低減するために優れた方法であると言え、大腿骨頭の部分的表面置換術やmetal-on-polymer、metal-on-metal人工股関節摺動面の摩擦・摩耗を低減するために有効であると確信している。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Tanaka Y, Doi H, Iwasaki Y, Hiromoto S, Yoneyama T, Asamid K, Imai H, Hanawa T: Electrodeposition of amine-terminated poly (ethylene glycol) to titanium surface. *Mat Sci & Eng C* 27: 206-212, 2007.
- 2) Wachiralarpphaithoon C, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Enzyme-degradable phosphorylcholine porous hydrogels cross-linked with polyphosphoesters for biocompatible cell matrices. *Biomaterials* 28: 984-993, 2007.
- 3) 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* 57: 226-236, 2007.
- 4) Nagase U, Oku M, Iwasaki Y, Ishihara K: Preparations of aromatic monomers and copolyamides containing phosphorylcholine moiety and the biocompatibility of copolyamides. *Polym J*; 39: 712-721, 2007.
- 5) Hoven VP, Srinanthakul M, Iwasaki Y, Iwata R, Kiatkamjornwong S: Polymer brushes in nanopores surrounded by silicon-supported tris (trimethylsiloxy)silyl monolayers. *J Colloid Interface Sci* 314: 446-459, 2007.
- 6) Iwasaki Y, Takami U, Shinohara U, Kurita K, Akiyoshi K: Selective biorecognition and preserving cell function on carbohydrates-immobilized phosphorylcholine polymers. *Biomacromolecules* 8: 2788-2794, 2007.
- 7) Iwasaki Y, Takami U, Shinohara U, Akiyoshi K: Control of cell function on carbohydrate-immobilized phosphorylcholine polymer surfaces. *European Cells and Materials* 14:72, 2007.
- 8) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Site-directed immobilization of antibodies on well-defined polymer brushes. *European Cells and Materials* 14: 66, 2007.
- 9) Iwasaki Y, Wachiralarpphaithoon C, Akiyoshi K: Novel thermoresponsive polymers having biodegradable phosphoester backbone. *Macromolecules* 40: 8136-8138, 2007.
- 10) Ohtsu N, Ashino T, Ishihara M, Sakamoto F, Hanawa T: Calcium-phosphate formation on titanium modified with newly developed calcium-hydroxide-slurry treatment. *Mater Trans* 48: 105-110, 2007.
- 11) Tanaka Y, Doi H, Kobayashi E, Yoneyama T, Hanawa T: Determination of the immobilization manner of amine-terminated poly (ethylene glycol) electrodeposited on a titanium surface with XPS and

- GD-OES. *Mater Trans* 48: 287-292, 2007.
- 12) Kobayashi E, Ando M, Tsutsumi Y, Doi H, Yoneyama T, Kobayashi M, Hanawa T: Inhibition effect of zirconium coating on calcium phosphate precipitation of titanium to avoid assimilation with bone. *Mater Trans* 48: 301-306, 2007.
- 13) Ohtsu N, Ito A, Saito K, Hanawa T: Characterization of calcium-titanate thin films deposited on titanium with reactive sputtering and pulsed laser depositions. *Surf Coat Tech* 201: 7686-7691, 2007.
- 14) Ohtsu N, Sato K, Saito K, Asami K, Hanawa T: Calcium phosphates formation on CaTiO₃ coated titanium. *J Mater Sci Mater Med* 18: 1009-1016, 2007.
- 15) Tanaka Y, Kobayashi E, Hiromoto S, Asami K, Imai H, Hanawa T: Calcium phosphate formation on titanium by low-voltage electrolytic treatments. *J Mater Sci Mater Med* 18: 797-806, 2007.
- 16) Sakamoto H, Doi H, Kobayashi E, Yoneyama T, Suzuki Y, Hanawa T: Structure and strength at the bonding interface between a titanium-segmentated polyurethane composite through 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate for artificial organs. *J Biomed Mater Res A* 82A: 52-61, 2007.
- 17) Ohtsu N, Sato K, Yanagawa A, Saito K, Kohgo T, Yokoyama A, Asami K, Hanawa T: CaTiO₃ coating on titanium for biomaterial application - optimum thickness and tissue response. *J Biomed Mater Res A* 82A: 304-315, 2007.
- 18) Hanawa T, Sakamoto H, Tanaka Y: Biofunctional hybrid of titanium with polymers. *Mater Sci Forum* 539-543: 563-566, 2007.
- 19) Tanaka Y, Doi H, Iwasaki Y, Yoneyama T, Hanawa T: Immobilization of poly(ethylene glycol) terminated with amino to titanium surface by electrodeposition. *Adv Mater Res* 15-17: 205-208, 2007.
- 20) Sakamoto H, Doi H, Kobayashi E, Hanawa T: A new technique of titanium and segmentated polyurethane complex through 3-(trimethoxysilyl) propylmethacrylate for artificial implants. *Adv Mater Res* 15-17: 125-128, 2007.
- 21) Sakamoto H, Hirohashi Y, Doi H, Noda K, Hanawa T: Effects of cross-linkage and hydroxyl groups on bonding strength between titanium and segmented polyurethane through 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate. *Mater Sci Forum* 561-565: 1477-1480, 2007.
- 22) Tanaka Y, Matsuo Y, Saito H, Tsutsumi Y, Doi D, Yoneyama T, Imai H, Hanawa T: Biofunctionalization of metal surface by immobilization of poly(ethylene glycol) terminated amine. *Adv Mater Res* 26-28: 765-768, 2007.
- 23) Iwata R, Sato R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Covalent immobilization of antibody fragments on well-defined polymer brushes via site-directed method. *Colloids and Surface B:*

Biointerfaces 62: 288-298, 2008.

24) Fujii K, Matsumoto HN, Koyama Y, Iwasaki Y, Ishihara K, Takakuda K: Prevention of biofilm formation with a coating of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer. *J Vet Med Sci* 70: 167-173, 2008.

25) 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.

26) Kyomoto M, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Super-lubricious surface mimicking articular cartilage by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on orthopaedic metal bearings. *J Biomed Mater Res A*, in contribution.

2.学会発表

① 国内学会

- 1) 齋藤陽香, 田中勇太, 堤祐介, 土居壽, 今井八郎, 埜隆夫: 金属への末端アミン修飾ポリエチレングリコール固定化に及ぼす表面水酸基の影響. *材料と環境2007(春季大会)*. 東京, 5月, 2007.
- 2) 坂本晴美, 土居壽, 田中勇太, 米山隆之, 埜隆夫: Ti表面水酸基量およびUV照射がTi/セグメント化ポリウレタン界面接合強度に及ぼす影響. *第49回日本歯科理工学会学術講演会*. 札幌, 5月, 2007.

- 3) 田中勇太, 坂本晴美, 土居壽, 米山隆之, 埜隆夫: 金属へのポリエチレングリコール固定化に及ぼす化学的因子の影響. *第49回日本歯科理工学会学術講演会*. 札幌, 5月, 2007.
- 4) 大家溪, 坂本晴美, 小林郁夫, 土居壽, 埜隆夫: TiとAuにおける骨芽細胞様細胞の骨分化特性. *第49回日本歯科理工学会学術講演会*. 札幌, 5月, 2007.
- 5) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 抗体フラグメントを集積したポリマーブラシによる高感度分子認識界面の構築. *第56回高分子学会年次大会*. 京都, 5.30, 2007.
- 6) 岩崎泰彦: 生体に倣ったポリマーバイオマテリアルの設計, *第19回生体機能関連化学若手の会サマースクール*, 八王子, 8月, 2007.
- 7) 榎本真司, 秋吉一成, 岩崎泰彦: ペプチドを複合化したポリホスホエステル調製と機能. *第56回高分子討論会*. 名古屋, 9.21, 2007.
- 8) 岩田綾子, 秋吉一成, 岩崎泰彦: ポリマーブラシを用いた高感度分子認識界面の創製- ブラシ構造と抗体集積化の関係. *第56回高分子討論会*. 名古屋, 9.21, 2007.
- 9) 堀口健二, 石原一彦, 岩崎泰彦, 長瀬裕, 下山田直矢: ホスホリルコリン基含有芳香族ポリマーの合成と生体適合性. *第56回高分子討論会*. 名古屋, 9.21, 2007.
- 10) 岩崎泰彦, 澤田晋一, 高見詩恵, 秋

- 吉一成: 細胞表層構造に倣った生体機能ポリマー界面の構築. 第56回高分子討論会. 名古屋, 9.21, 2007.
- 11) 田中勇太, 仲井正昭, 赤堀俊和, 新家光雄, 堤祐介, 土居壽, 埜隆夫: 生体用 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 合金の表面解析と生体機能分子固定化処理. 表面技術協会第116回講演大会. 長崎, 9月, 2007.
- 12) 松尾悠, 田中勇太, 堤祐介, 土居壽, 今井八郎, 埜隆夫: チタン表面に固定化したポリエチレングリコール分子の配向性評価. 表面技術協会第116回講演大会. 長崎, 9月, 2007.
- 13) 齋藤陽香, 田中勇太, 堤祐介, 土居壽, 今井八郎, 埜隆夫: 金属へのポリエチレングリコール固定化に及ぼす表面水酸基の影響. 表面技術協会第116回講演大会. 長崎, 9月, 2007.
- 14) 堤祐介, 西村大地, 土居壽, 小林郁夫, 埜隆夫: 電気化学処理によるジルコニウム表面でのリン酸カルシウム形成. 日本金属学会2007年秋期(第141回)大会. 岐阜, 9月, 2007.
- 15) 田中勇太, 仲井正昭, 赤堀俊和, 新家光雄, 堤祐介, 土居壽, 埜隆夫: Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 合金の表面酸化物組成. 日本金属学会2007年秋期(第141回)大会. 岐阜, 9月, 2007.
- 16) 小合政公, 堤祐介, 土居壽, 埜隆夫, 野田和彦: Ti-Au 間のガルバニー電流による Ti 表面のリン酸カルシウム生成. 日本金属学会2007年秋期(第141回)大会. 岐阜, 9月, 2007.
- 17) 廣橋洋平, 坂本晴美, 堤祐介, 土居壽, 野田和彦, 埜隆夫: チタン/セグメント化ポリウレタン界面接合強度に及ぼす湿度および酸素の影響. 日本金属学会2007年秋期(第141回)大会. 岐阜, 9月, 2007.
- 18) 京本政之, 岩崎泰彦, 茂呂徹, 宮路史明, 金野智浩, 川口浩, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦: 長寿命人工関節のためのリン脂質グラフトポリマーによる高潤滑性 Co-Cr-Mo 合金の創製. 第29回日本バイオマテリアル学会. 大阪, 11.26-27, 2007.
- 19) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 精密設計されたポリマーブラシ表面における生体分子の機能誘導. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 大阪, 11.26-27, 2007.
- 20) 岩崎泰彦, 榎本真司, 秋吉一成: ポリリン酸エステルを基盤とした新規生分解性バイオマテリアルの創製. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 大阪, 11.26-27, 2007.
- 21) 田中勇太, 齋藤陽香, 松尾悠, 堤祐介, 土居壽, 米山隆之, 埜隆夫: 電着による金属表面への生体機能分子固定化制御および機能評価. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 大阪, 11.26-27, 2007.
- 22) 大家溪, 田中裕生子, 坂本晴美, 木村剛, 堤祐介, 土居壽, 岸田晶夫, 埜隆夫: 骨芽細胞様細胞骨分化特性の金属における相違. 第29回日

- 本バイオマテリアル学会大会. 大阪, 11.26-27, 2007.
- 23) 西村大地, 堤祐介, 小林郁夫, 土居壽, 塙隆夫: Ti表面での骨形成を防止するZr被覆. **第29回日本バイオマテリアル学会大会**. 大阪, 11.26-27, 2007.
- 24) 小合政公, 小林郁夫, 堤祐介, 土居壽, 塙隆夫, 野田和彦: Ti-Au間ガルバニー電流によるTi表面の骨形成促進. **第29回日本バイオマテリアル学会大会**. 大阪, 11.26-27, 2007.
- ② 国際学会
- 1) Hanawa T, Tanaka Y, Doi H, Kobayashi E, Yoneyama T: Immobilization of poly(ethylene glycol) to titanium surface. **The 11th World Conference on Titanium (JIMIC-5)**, Kyoto, Japan, June, 2007.
- 2) Sakamoto H, Hirohashi Y, Doi H, Tsutsumi Y, Yoneyama T, Hanawa T: Creation of titanium and segmented polyurethane composite through silane coupling agent for artificial organs. **The 6th International Symposium on Titanium in Dentistry**, Kyoto, Japan, June, 2007.
- 3) Tanaka Y, Saito H, Matsuo Y, Tsutsumi Y, Doi H, Yoneyama T, Hanawa T: Biofunctionalization of metal surface with electrodeposition. **The 6th International Symposium on Titanium in Dentistry**, Kyoto, Japan, June, 2007.
- 4) Oya K, Nakagawa R, Sakamoto H, Ito Y, Kimura T, Kobayashi E, Doi H, Kishida A, Hanawa T: Bone differentiation property of osteoblast-like cells on titanium and gold. **The 6th International Symposium on Titanium in Dentistry**, Kyoto, Japan, June, 2007.
- 5) Nishimura D, Doi H, Tsutsumi Y, Hanawa T, Kobayashi E: Elucidation of phosphate precipitation mechanism on Ti and Zr by cathodic polarization in Hanks' solution. **The 6th International Symposium on Titanium in Dentistry**, Kyoto, Japan, June, 2007.
- 6) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Oriented immobilization of antibody fragments on polymer brushes for highly sensitive biorecognition. **234th ACS National Meeting**, Boston, USA, August, 2007.
- 7) Tanaka Y, Tsutsumi Y, Doi H, Yoneyama T, Hanawa T: Electrodepositional immobilization manners of poly(ethylene glycol) on titanium. **BIOSURF VII Functional Interfaces for Directing Biological Response**, Zurich, Switzerland, Aug, 2007.
- 8) Iwasaki Y, Takami U, Shinohara K, Akiyoshi K: Control of cell function on carbohydrate-immobilized phosphorylcholine polymer surfaces, **Biosurf VII**, Zurich, Switzerland, September, 2007.
- 9) Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K: Site-directed immobilization of antibodies on well-defined polymer brushes. **Biosurf VII**, Zurich, Switzerland, September, 2007.
- 10) Iwasaki Y: Interfacing biomembrane-mimetic polymer

surfaces with living cells. *The 1st International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials*, Chengdu, China, November, 2007.

- 11) Sakamoto H, Hirohashi Y, Doi H, Noda K, Hanawa T: Effects of cross-linkage and hydroxyl groups on bonding strength between titanium and segmented polyurethane through 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate. *The 6th Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM6)*, Jeju Island, Korea, November, 2007.

- 12) Tanaka Y, Matsuo Y, Saito H, Tsutsumi Y, Doi D, Yoneyama T, Imai H, Hanawa T: Biofunctionalization of metal surface by immobilization of poly(ethylene glycol) terminated amine. *The 6th Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM6)*, Jeju Island, Korea, November, 2007.

- 13) Matsuo Y, Tanaka Y, Tsutsumi Y, Doi H, Imai H, Hanawa T: Surface characterization of the orientation of poly(ethylene glycol) immobilized on titanium surface. *1st Asian Biomaterials Congress*, Tsukuba, Japan, December, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) PCT/JP2007/065839
「表面改質用化合物およびそれを用いた表面改質方法」
PCT/JP2007/065839
出願日: 2007.8.14

- 2) 特願2007-219502
「温度応答性を有するポリホスフェート化合物およびその製造方法」
特願: 2007-219502
出願日: 2007.8.27

- 3) PCT/JP2007/67061
「ホスホリル基を有するジアミン化合物、その重合体ならびに製造方法」
PCT/JP2007/67061
出願日: 2007.8.31

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 准教授）

研究要旨：本研究では、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine ポリマー（PMPC）処理した超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）の生体内安全性を調べる目的で、PMPC を用いて、細菌を用いた復帰突然変異試験、V79 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、マウスを用いた急性毒性試験を行い、基礎的な生物学的安全性を評価した。本試験条件下において、いずれの試験においても PMPC 水溶液の安全性が確認された。PMPC 処理 UHMWPE の臨床使用状況を考慮して、細胞、局所組織及び全身の各レベルにわたって生物学的安全性上の問題を見出そうとしたが、いずれの試験項目についても、毒性の兆候は認められず、PMPC が生物学的安全性の面で極めて高い安全性を有することが確認された。また、現時点における科学・技術知識の水準に照らし、実施した試験項目で、生物学的安全性の評価が十分であると考えられる。PMPC 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をもつ 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine ポリマー（PMPC）を光グラフト重合した超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）表面を創製し（PMPC 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、PMPC 処理 UHMWPE の著しい低摩耗を確認した。

PMPC 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。PMPC 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 製品当りに使用される量は約 $0.4 \mu\text{g}$ 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 kg として算出した約 43.6 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、PMPC 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、PMPC 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 PMPC 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、PMPC 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、ラットにおける骨内埋植試験及びウサギを用いた 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、PMPC 単体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、V79 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、マウスを用いた急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

PMPC を被験体として、種々の試験を実施した。

1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

PMPC 水溶液について細菌を用いる復帰突然変異試験をプレーンキューベーション法により実施した。

(a) 被検物質 (PMPC)

被験物質である PMPC 水溶液（ポリマー濃度：4.8%（約 5%））は、透明粘性の液体で、日本油脂株式会社から提供され、使用時まで室温下で保管した。

なお、被検物質の安定性については、室温にて保管した被検物質についての性状の確認、赤外分光スペクトル、pH 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。

(b) 対照材料

陽性対照物質として用いた試料を表 1 にまとめる。

表 1 細菌を用いる復帰突然変異試験に用いた陽性対照物質

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ)-2-フリルアクリルアミド	AF-2	PKE1831 (2006年4月18日)	和光純薬工業	99.5%
7-シロキサ	SA	LTQ5118 (2006年4月18日)	和光純薬工業	99.7%
9-フリルアクリン	9AA	AO176874001 (2006年4月25日)	Acros Organics	97.6%
2-フリルアクリン	2AA	EWL3616 (2006年4月18日)	和光純薬工業	95.8%

AF-2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業) に、SA は日局注射用水（大塚製薬）に溶解し、所定の濃度に調製したのち、冷凍保存（設定温度：-20℃）し、調製後 6 か月以内に用時解凍して用いた。

各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す（表 2）。

表 2 細菌を用いる復帰突然変異試験に用いた陽性対照物質調整液

菌 株	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
	物質名 (添加量:μL/plate)	調製濃度 (μg/mL)	物質名 (添加量:μL/plate)	調製濃度 (μg/mL)
<i>Salmonella typhimurium</i>				
TA100	AF-2(100)	0.1	2AA(100)	10
TA1535	SA (100)	5	2AA(20)	100
TA98	AF-2(100)	1	2AA(50)	10
TA1537	9AA(100)	800	2AA(20)	100
<i>Escherichia coli</i>				
WP2 uvrA	AF-2(100)	0.1	2AA(100)	100

(c) 検定菌

「遺伝毒性試験ガイドライン」に従い、試験には、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 uvrA を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌球は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 uvrA 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士より分与された。*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異、*E. coli* WP2 uvrA 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検出菌は冷凍保存（設定温度：-80℃）したものをを用いた。凍結保存菌は、液体培地にて 37℃で静止期の初期まで培養した菌液 0.8 mL に対し、滅菌 DMSO を 0.07 mL の割合で加えてプラスチックチューブに分注し、急速凍結して調製した。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異 (*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101（プラスミド）の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が維

持されていることを確認して試験に用いた。

(d) 被験物質調製液の調製

被験物質は水溶液であるため、溶媒には日局注射用水を用いた。試験に際しては、被験物質原液（原液）をそのまま、あるいは原液を日局注射用水との混合により段階希釈して被験物質調製液（原液を含む）を調製した（調製量：2 mL 以上）。ポリマーの濃度換算は行わなかった。被験物質調製液は用時調製して試験に用いた。被験濃度を以下に示す。なお、()内の数値は、被験物質調製液 100 μ L 中の被験物質原液の用量をそれぞれ示す。

本試験：

6.25、12.5、25.0、50.0、100 v/v%
(6.25、12.5、25.0、50.0、100 μ L)

(e) 試験菌液の作製

凍結保存菌を解答後、すみやかにニュートリエントブロス No.2 (Oxoid) を 12 mL 入れた L 字型試験管（容積：29 mL）に 12 μ L (TA100、TA1535 および TA98)、24 μ L (TA1537) あるいは 6 μ L (WP2 *uvrA*) 接種し、4°C で保冷後、37°C で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3（大洋科学工業）を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。試験菌液の増殖の確認のため、分光光度計（型式：UV-120-02、島津製作所）により、試験菌液の吸光度を 660 nm で測定した。また、段階希釈法により、660 nm の吸光度の測定値および生菌数を表 3 に示す。

表 3 660 nm の吸光度の測定値および生菌数

試験の種類	検定菌					
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
用量設定試験	OD ₆₆₀	1.852	2.00	1.966	1.952	1.803
	生菌数 ($\times 10^8$ cells/mL)	2.01	2.18	3.40	1.91	1.13
本試験	OD ₆₆₀	1.859	1.982	1.992	1.977	1.857
	生菌数 ($\times 10^8$ cells/mL)	2.36	2.06	3.78	2.09	1.08

(f) 試験法

Ames らの標準法を参考にして、プレインキュベーション法により、用量設定試験および本試験を各々 1 回実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下および哺乳動物（ラット）のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム - リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトッパアガーを加えて混和し、最小グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37°C で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11、システムサイエンス) または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量につき 2 枚ずつとし、それぞれの平均値を求めた。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

2. V79 細胞を用いたコロニー形成試験

チャイニーズ・ハムスター肺由来の V79 細胞を用いたコロニー形成試験により、細胞毒性作用を検討した。

(a) 被検物質 (PMPC)

被検物質である PMPC 水溶液は、透明粘性の液体で、日本油脂株式会社から提供され、使用時まで室温下で保管した。

(b) 陽性対照物質

細胞の感度および実験条件の精度を確認するため zinc di-n-butylthiocarbamate (ZDBC、和光純薬工業) を陽性対照物質として用いた。陽性対照物質は、DMSO (和光純薬工業) に溶解して希釈した。

(c) 細胞

V79 細胞は JCRB 細胞バンクより入手した。入手した時点で 5 代のものを、さらに 14 代まで継代して凍結保存 (マイコプラズマ陰性) した。これを解凍後 2 代で試験に用いた。培養は、ウシ胎児血清 (Moregate) を 10vol% 含む Eagle's MEM 培地 (MEM10 培地) を用い、CO₂ インキュベーター (CO₂ 濃度 5%、37°C) 内で培養した。

(d) 細胞毒性試験

被検物質は PMPC の約 5% の水溶液であることから、本試験における濃度を PMPC の濃度で記載した。また、被検物質は水溶液であることから、溶媒として日局注射用水 (大塚製薬工場) を用いた。被検物質原液およびその原液を、溶媒を用いて公比 2 で希釈し 8 段階の試験液 (0.375、0.750、1.50、3.00、6.00、12.0、24.0、48.0 mg/mL) を調製し、これらの試験液を培地に対して

10 vol% 添加して処理 (0.0375、0.0750、0.150、0.300、0.600、1.20、2.40、4.80 mg/mL) を行った。

V79 細胞は 0.25% トリプシンを用いて単離した後、細胞濃度 103 個/mL の懸濁液とし、この細胞懸濁液 0.1 mL (100 個) を 2 mL の MEM10 培地の入っている 6 ウェルプレートに分注した。播種翌日、ウェル内の培地を除き、新鮮な MEM10 培地 1.8 mL を加えた後、日局注射用水 (陰性対照) および段階希釈した被検物質の試験液を、それぞれ培地に 0.2 mL ずつ添加し (溶媒濃度 10 vol%)、CO₂ インキュベーターで 6 日間培養した。

培養終了後、培地を除き、メタノールで固定し、10 vol% ギムザ液で染色した。ウェルあたりのコロニー数 (50 個以上の細胞からなるものを 1 個とした) を多目的高速画像解析装置 (PCA-II、システムサイエンス) および目視で計測し、陰性対照群と比較して各処理群の相対コロニー形成率を算出し、IC₅₀ 値を求めた。また、コロニー形成能 (陰性対照群のコロニー数 / 100) を算出した。

3. チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

染色体異常誘発作用を評価するため、PMPC 水溶液の CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

(a) 被検物質 (PMPC)

被検物質である PMPC 水溶液は、透明粘性の液体で、日本油脂株式会社から提供され、使用時まで室温下で保管した。

(b) 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質

としてマイトマイシン C (MMC、協和発酵工業) を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド (CP、Sigma Chemical) を用いた。これらの陽性対照物質を日局注射用水 (大塚製薬工業) に溶かし、原液 (MMC : 20 μ g/mL、CP : 1 mg/mL) を用時調製して試験に用いた。

(c) 細胞、培養条件及び S9 反応液

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国においては染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手し、継代後、液体窒素 (気相) 中に凍結保存 (現在の継代数 23) した。その細胞 (倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし) を、解凍後、継代 2 代 (細胞増殖抑制試験) および 7 代 (染色体異常試験) で試験に用いた。

培養には、仔牛血清 (CS、JRH Biosciences) を 10 vol% 添加した Eagle's MEM 培養液 (10%CS/MEM) を用い、CO₂ インキュベーター (5%CO₂、37°C、過失条件下) 内で培養した。Eagle's MEM 培地培養液は、Eagle's MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬) 9.4 g に対して精製水を 1 L の割合で加えて溶解し、高圧蒸気滅菌 (121°C、15 分) したものに、L-グルタミン (日水製薬) を約 0.3 g、10 w/v% NaHCO₃ 水溶液を約 20 mL の割合となるように無菌的に混合して調製したものをを用いた。

S9 (キッコーマン) は、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投

与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽 (-80°C) に保管した。グルコース-6-リン酸 (G-6-P、Sigma Chemical)、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (β -NADP⁺、オリエンタル酵母工業) および KCl を精製水に溶かし、混合液として超低温槽 (-80°C) に保管し、使用時はこれに S9、MgC₁₂ および HEPES (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM : S9 mix を 22 : 5 の割合で混和した S9 反応液 (2.7mL/ディッシュ) を加えて処理を行った (各成分の最終濃度 : 5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β -NADP⁺、0.83 mmol/L MgC₁₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

(d) 被験物質調製液の調製

被験物質は水溶液であることから溶媒として日局注射用水 (大塚製薬工場) を用いた。被験物質原液 (100 vol% 溶液、ポリマー濃度 : 4.8%、48 mg/mL) を溶媒で段階希釈して下記の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 10 vol% 添加して処理を行った。なお、被験物質は PMPC の水溶液であることから、被験物質濃度については PMPC 濃度で表した。

染色体異常試験 :

6.0、12、24、48 mg/mL (公比 2)

(e) 染色体異常試験

すべての処理条件において 4.8