

- 若手の会, 愛知, 8月, 2006.
- 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, 5月, 2006.
 - 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, 5月, 2006.
 - 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, 8月, 2006.
 - 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, 9月, 2006.
 - 10) 岩田綾子, 岩崎泰彦, 秋吉一成: 抗体固定化ブロックコポリマーブラシの調整とバイオ認識界面への応用. **第55回高分子論会**, 富山, 9月, 2006.
 - 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, 9月, 2006.
 - 12) 米山隆之, 岩崎泰彦, 福島修, 土居壽, 小林郁夫, 埴隆夫: 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, 9月15-16, 2006.
 - 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, 11月, 2006.
 - 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**, 11月, 2006.
 - 15) 齋藤陽香, 田中勇太, 堤祐介, 土居壽, 今井八郎, 埴隆夫: 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.
 - 16) 坂本晴美, 土居壽, 田中勇太, 米山隆之, 埴隆夫: 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.
 - 17) 田中勇太, 坂本晴美, 土居壽, 米山隆之, 埴隆夫: 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.
 - 18) 大家溪, 坂本晴美, 小林郁夫, 土居壽, 埴隆夫: 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.
 - 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 榎本真司, 秋吉一成, 岩崎泰彦: ペプトを複合化したポリホスホエステルの調製と機能. 第56回高分子討論会. 名古屋, 9.21, 2007.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 田中勇太, 仲井正昭, 赤堀俊和, 新家光雄, 堤祐介, 土居壽, 埴隆夫: 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处理. 表面技術協会第116回講演大会. 長崎, 9月, 2007.
- 26) 松尾悠, 田中勇太, 堤祐介, 土居壽, 今井八郎, 埴隆夫: 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.
- 27) 齋藤陽香, 田中勇太, 堤祐介, 土居壽, 今井八郎, 埴隆夫: 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.
- 28) 堤祐介, 西村大地, 土居壽, 小林郁夫, 埴隆夫: 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.
- 29) 田中勇太, 仲井正昭, 赤堀俊和, 新家光雄, 堤祐介, 土居壽, 埴隆夫: 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.
- 30) 小合政公, 堤祐介, 土居壽, 埴隆夫, 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.
- 31) 廣橋洋平, 坂本晴美, 堤祐介, 土居壽, 野田和彦, 埴隆夫: 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 田中勇太, 齋藤陽香, 松尾悠, 堤祐介, 土居壽, 米山隆之, 塙隆夫: 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.
- 36) 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, 塙隆夫: 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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：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 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine ポリマー（PMPC）を光グラフト重合（PMPC 処理）し、著しい低摩耗を実現した。本研究では、PMPC 処理した UHMWPE の基礎的な生物学的安全性を調べる目的で、V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験、90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験を行った。V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験の結果は陰性であり、PMPC の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。また、90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験においても、PMPC 処理 UHMWPE は、対照物質の 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。続いて、PMPC の基礎的な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、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により評価した。いずれの試験においても PMPC 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、局所組織およ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 および PMPC 処理 UHMWPE 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およびカテーテル 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 μg 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)、および「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、およ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、染色体異常試験、感作性試験およびラッ

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、PMPC 処理 UHMWPE の基礎的な生物学的安全性を調べる目的で、V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験およびウサギを用いた 90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験を行った。続いて、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

1. PMPC 処理 UHMWPE についての V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験

人工股関節用 UHMWPE 表面に対し、PMPC 処理した。これらを用い、V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験を行った。

① 被検物質 (PMPC 処理 UHMWPE)

UHMWPE (GUR1020 レジン、分子量：約 350 万、純度：99.0%、架橋処理 (CLPE)) 円板 (直径 14 mm、厚さ 0.8 mm) を基材とし、その片側表面を PMPC 処理した。PMPC 処理後、窒素ガス雰

囲気下にて、ガンマ線滅菌を施した。試験片は、試験使用時まで室温、遮光下で保管した。

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

陰性材料として組織培養用プラスチックシート (直径 14 mm、滅菌済み、和光純薬工業) を、被検物質の毒性の知るための標準材料として、0.25% zinc di-n-butylthiocarbamate (ZDBC) 含有ポリウレタンフィルム (直径 14 mm、食品薬品安全センター) を EOG 滅菌 (40℃、6 時間) したのち試験に用いた。

③ 細胞

V79 細胞は JCRB 細胞バンクより 1988 年 9 月 2 日に入手した。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、牛胎児血清 (Moregate) を 10 vol% 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℃) 内で培養した。

④ 直接接触法による細胞毒性試験

直接接触法により細胞が PMPC 処理 UHMWPE に直接接触した場合の影響を

調べた。

PMPC 処理 UHMWPE (PMPC 処理を施した面を上側)、組織培養用プラスチックシート、および 0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルムを、24 ウェルプレート (ウェル直径: 15 mm) のウェル底面にそれぞれ密着させた。また、陰性対照としては、何も置かないウェル (未処理ウェル) を用意した。

V79 細胞を、0.25% トリプシンを用いて単離した後、細胞濃度 100 個/mL の懸濁液とした。この細胞懸濁液 0.5 mL (50 個) をウェル内に播種し、6 日間培養した。

培養後、培地を除き、メタノールで固定し、10vol% ギムザ液で染色した。ウェル内に形成されたコロニー (50 個以上の細胞からなるものを 1 個とした) を顕微鏡下で数え、陰性対照 (未処理ウェル) に対する各処理群の相対コロニー形成率を算出した。染色されたプレートは、試験系の全体および各群より 1 ウェルを選択し、写真撮影した。1 群あたり 3 ウェルを用いた。

2. PMPC 処理 UHMWPE についてのウサギを用いた 90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験

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。板状の被験体および対照試料の未処理 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、血液生化学的検査および病理組織学的検査等を実施した。

① 被検物質 (PMPC 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、1-①項に記載の方法にて、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。

② 対照材料

陰性材料として、未処理 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

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、入荷時の体重は平均 3.525 kg、埋植時の体重は平均 3.603 kg であった。

④ 埋植方法

臨床適用部位が関節腔内であるため、PMPC 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。埋植期間は 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。

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。被験物質を滅菌生理食塩液で洗浄した後、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。

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、平均赤血球色素量および平均赤血球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 γ -グルタミルトランスペプチターゼ（ γ -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、頸骨近位端、膝蓋骨および関節包の一部を 0.1 M 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

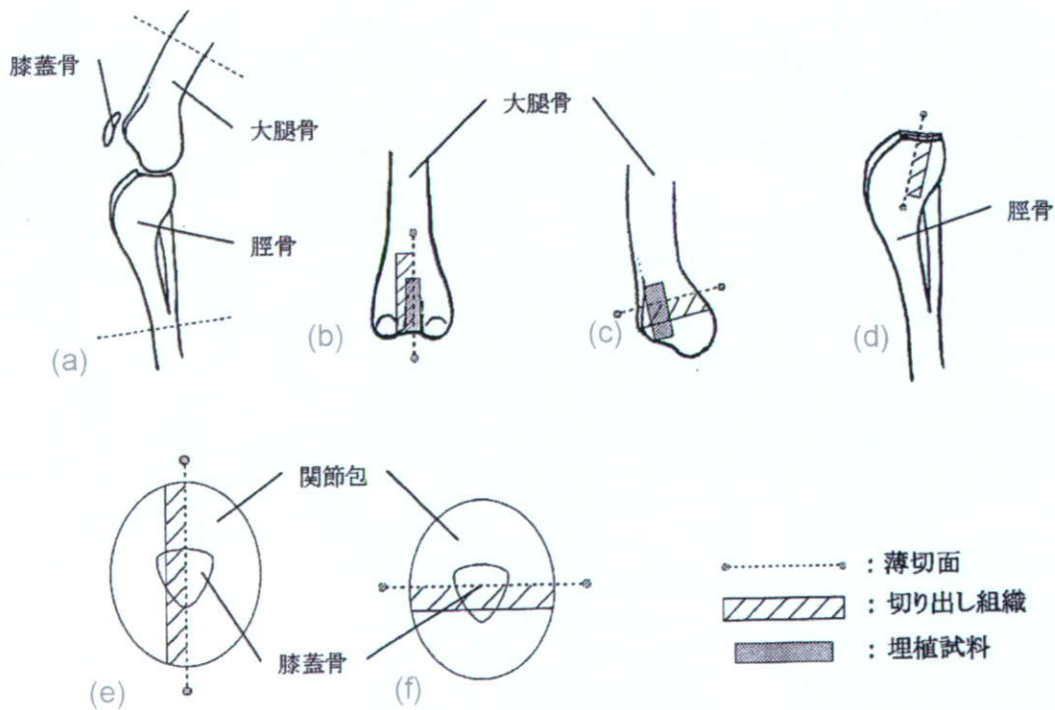


図 1 埋植部、脛骨近位端、膝蓋骨および関節包付近のパラフィン包埋ブロック作製部位

定した。なお、すべての器官および組織の長期保存には 0.1 M 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。

3. PMPC についての細菌を用いる復帰突然変異試験

PMPC について細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

① 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。

② 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	AP-2	PKE1831 (2006年4月18日)	和光純薬工業	99.5%
アジ化ナトリウム	SA	LTQ5118 (2006年4月18日)	和光純薬工業	99.7%
9-アミノアクリン	9AA	A0176874001 (2006年4月25日)	Acros Organics	97.6%
2-アミノアントラセン	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°C) 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製液

菌 株	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
	物質名 (添加量: $\mu\text{L}/\text{plate}$)	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	物質名 (添加量: $\mu\text{L}/\text{plate}$)	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<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

③ 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°C) したものをを用いた。凍結保存菌は、液体培地にて 37°C 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、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

④ 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 μL 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 μL)

⑤ 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 μL (TA100、TA1535 および TA98)、24 μL (TA1537) あるいは 6 μL (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

⑥ 試験方法

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 のトッペ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。

4. PMPC についての 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、PMPC の細胞毒性作用を検討した。

① 被験物質 (PMPC)

3-①項に記載の被験物質と同様の PMPC 水溶液を用いた。

② 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 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。

③ 細胞

1-③項に記載の細胞と同様の V79 細胞を用いた。

④ 細胞毒性試験

被験物質原液およびその原液を、日局注射用水 (大塚製薬工場) 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験物質の試験液を、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。

5. PMPC についてのチャイニーズ・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。

① 被検物質（PMPC）

3-①項に記載の被験物質と同様の PMPC 水溶液を用いた。

② 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 μg/mL、CP：1 mg/mL）を用時調製して試験に用いた。

③ 細胞、培養条件および S9 反応液

CHL/IU 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）内で培養した。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ジン酸（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、MgCl₂ 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（2.7 mL/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 MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES）。

④ 被験物質調製液の調製

被験物質原液を日局注射用水（大塚製薬工場）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。

染色体異常試験：

6.0、12、24、48 mg/mL（公比 2）

⑤ 染色体異常試験

すべての処理条件において 4.8 mg/mL の濃度を最高処理濃度として、公比 2 で計 4 濃度群を設定した。その他、陰性（溶媒）対照群および陽性対照群を設けた。1 濃度あたり 4 枚のディッシュを用い、そのうちの 2 枚は染色体標本作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。また、陰性対照群と被験物質処理群については、処理開始時および処理終了時における培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。陽性対照群については、日局注射用水（大塚製薬工場）を 10 vol% 加えたのち、MMC (20 μ g/mL) を、S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 μ L/ディッシュ（最終濃度：0.1 μ g/mL）、連続処理では 12.5 μ L/ディッシュ（最終濃度：0.05 μ g/mL）添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では、日局注射用水を 10 vol% 加えたのち、CP (1 mg/mL) を 30 μ L/ディッシュ（最終濃度：10 μ g/mL）添加した。染色体標本作製のディッシュについては、培養終了の 2 時間前にコルセミドを最終濃度が 0.1 μ g/mL となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02 w/v% EDTA 含有 PBS (Ca²⁺および Mg²⁺ 不含) をディッシュあたり 5 mL 加えて細胞をはがし、15 mL の遠沈管に移した。遠沈 (1000~1500 rpm、約 5 分) し、

上清を捨てた後、3 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液（メタノール：氷酢酸 = 3 : 1 (v/v)）を約 6 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 6 枚のスライド標本作製した。

作製したスライド標本を 70 vol% メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol% ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製) で約 8 分染色後、水道水ですすいで風乾した。

⑥ 染色体分析

染色体分析に先立って、1 ディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて濃度の高い方から分裂指数の分析 (500 細胞/標本) を行った。0.5% 未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不可能と判断し、分析可能な最高濃度群を決定し、その濃度とそれより低い 2 濃度を観察対象群とした。

染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個の分裂中期細胞 (染色体数：23~27 本) について構造異常の種類と数を、1 群あたり 800 個の分裂中期細胞について倍数性細胞 (染色体数が 38 本以上) の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会) による分類法に基づいて行った。

6. PMPC についてのモルモットにおける皮膚感作性試験

PMPC 水溶液の接触感作性の有無を検討する目的で、モルモットにおける皮膚感作性試験 (Maximization test) を実施した。

① 被検物質 (PMPC)

3-①項に記載の被験物質と同様のPMPC水溶液を用いた。

② 陽性対照物質

陽性対照物質には、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB、和光純薬工業) を選択した。DNCBは、一次感作および二次感作ではオリブ油、惹起ではエタノールに溶解した。DNCBの濃度は、一次感作および二次感作では0.1 w/v%、惹起では0.1および0.01 w/v%とした。

③ 免疫増強剤と感作増強剤

一次感作時には、免疫増強剤として Freund's complete adjuvant (FCA、Difco Lab.) を用いた。FCAと注射用水およびMPCホモポリマー水溶液は、等量 (v/v) ずつポリエチレンチューブで接続したルアーロックシリンジに入れて混合し、油中水 (w/o) 型乳化物とした。FCAとDNCBとは等量混合液とした。二次感作時には、感作増強措置として10 w/w%ラウリル硫酸ナトリウム (SLS、和光純薬工業) を用いた。

④ 使用動物

4週齢のHartley系モルモット (Slc:Hartley, SPF) を、日本エスエルシーから購入し、入荷日を含む7日間の検疫・馴化終了後、飼育室に移して群分けを行い、投与開始前日までをさらに馴化期間とした。動物の一般状態および体重増加にはなんら異常は認められなかった (表4)。

表4 使用したモルモット

動物の入荷日、入荷動物数、性および体重
動物入荷日:2007年8月2日
入荷動物数、性:28匹、雌(非妊娠、未経産)
入荷時体重:244~269g
検疫終了時体重:304~343g
予備試験動物の適用日体重(6匹):354~382g
本試験動物の実験開始日体重(20匹):369~443g

⑤ 感作性試験

表5に、群構成、動物数および動物番号を示す。

表5 群構成

群	動物数	動物番号
I 群 : P(MPC)投与群	10匹(I-1~I-10)	
II 群 : 陰性対照群	5匹(II-1~II-5)	
III 群 : 陽性対照群(DNCB)	5匹(III-1~III-5)	
計20匹		

一般状態の観察は、動物飼育期間中毎日1回行った。体重測定は、予備試験開始日、実験開始日[一次感作日(処置第1日)]、二次感作開始日(処置第8日)、処置第15日、惹起開始日(処置第22日)および実験終了日(処置第25日、貼付物除去後48時間判定日)に行った。なお、体重測定の結果に関しては、群の平均値と標準偏差を求めた。

肩甲骨上部皮膚のうち、約2×4cmの区画の6か所(図2の①~③、左右対称)に、以下の①~③に示した投与検体を0.1mLずつ皮内投与(処置第1日)した。なお、DNCBにおいてFCAとの混合液を投与する③では、②で用いた各投与検体の2倍の濃度のものにFCAを等量加えて混合し、最終濃度を②と同じ濃度にしたものを投与した。

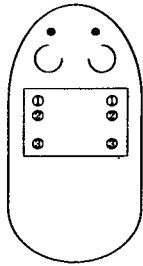


図2 感作皮内投与の位置

1) 前方左右

全群共通：

FCA と注射用水の 1:1 の油中水 (w/o) 型乳化物

2) 中部左右

I 群：5 w/v% PMPC 水溶液

II 群：注射用水

III 群：0.1 w/v% DNCB オリブ油溶液

3) 後方左右

I 群：FCA と 5 w/v% PMPC 水溶液の 1:1 油中水 (w/o) 型乳化物

II 群：FCA と注射用水の 1:1 の 1 油中水 (w/o) 型乳化物

III 群：FCA と 0.2 w/v% DNCB オリブ油溶液の 1:1 の混合液

一次感作の 6 日後 (処置第 7 日) に、皮内投与部位を含む肩甲骨上部の区域 (図 2 の点線内) に 10 w/w% SLS を開放塗布し、その翌日 (処置第 8 日)、SLS をティッシュペーパーで拭き取った後、二次感作を開始した。二次感作では、SLS 塗布部に、以下に示した投与検体を 0.2 mL ずつ吸収させた濾紙を貼付し、さらにその上を粘着性伸縮包帯で保持して 48 時間閉塞塗布した。

4) 感作貼付物質

I 群：5 w/v% PMPC 水溶液

II 群：注射用水

III 群：0.1 w/v% DNCB オリブ油溶液

⑥ 惹起

二次感作を開始した 14 日後 (処置第 22 日) に惹起を開始した。惹起では、図 3 に示した各部位 (1~6) に、以下に示した投与検体を 0.1 mL ずつ吸収させたリント布を貼付し、さらにその上を粘着性伸縮包帯で保持して 24 時間閉塞貼付した。

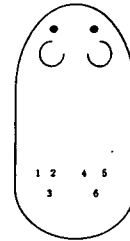


図3 惹起の位置

惹起物質

I、II 群：

[左側腹部]

前部・腹側 1 : 5 w/v% PMPC 水溶液

前部・背側 2 : 0.5 w/v% PMPC 水溶液

後部 3 : 0.05 w/v% PMPC 水溶液

[右側腹部]

前部・背側 4 : 0.005 w/v% PMPC 水溶液

前部・腹側 5 : 0.0005 w/v% PMPC 水溶液

後部 6 : 注射用水

III 群：

[左側腹部]

腹側 1 : 0.1 w/v% DNCB エタノール溶液

背側 2 : 0.01 w/v% DNCB エタノール溶液

[右側腹部]

4 : エタノール

⑦ 判定および評価

判定は、貼付物除去後 24 時間および 48 時間における各貼付部位の皮膚反応について、Draize 法の判定基準

に準拠して行った（表 6 および 7）。
 惹起濃度ごとに評価点が 1 以上を示した動物を陽性として、陽性率および平均評価点を各々次式から求めた。

表 6 紅斑および痂皮の形成（紅斑）

	評価点
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
中等度ないし高度紅斑	3
高度紅斑からわずかな痂皮の形成（深部損傷まで）	4
	[最高点 4]

表 7 浮腫の形成（浮腫）

	評価点
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
中等度浮腫（約 1 mm の膨隆）	3
高度浮腫（1 mm 以上の膨隆と暴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]

陽 性 率：
 $(\text{群の陽性動物数} / \text{群の動物数}) \times 100$

平均評価点：
 $\text{群の評価点の総計} / \text{群の動物数}$

7. PMPC についてのマウスにおける急性毒性試験

マウスにおける急性毒性試験を行った。

① 被検物質（PMPC）

3-①項に記載の被験物質と同様の PMPC 水溶液を用いた。

② 対照液

対照液として日局生理食塩液（光製薬）を用いた。

③ 使用動物と飼育方法

3 週齢の雄マウス (Cr1j:CD1 (ICR)、SPF 動物、日本チャールス・リバー) を購入し、検疫終了時の体重が 17～23 g の動物を 10 匹選択して使用した。

表 8 急性毒性試験における群分け

群	投与液	投与経路	投与容量	動物数	動物番号
第 1 群	対照液	静脈内投与	50 mL/kg	5 匹	1～5
第 2 群	試験液	静脈内投与	50 mL/kg	5 匹	6～10

④ 投与方法と容量

試験液を 1 群 5 匹（第 2 群）のマウスの尾静脈内に 50 mL/kg [投与日（群分け時）の体重を基に算出] の容量で 0.1 mL/5 秒の速度で 1 回投与した。他の群の 5 匹（第 1 群）には同様の方法で対照液を投与した。

⑤ 一般状態の観察

全例について、投与直後、投与後 4、24、48 および 72 時間に一般状態を観察し、表 9 に示した一般状態の分類に従って、毒性症状を記録した。

表 9 一般状態の分類

反応	投与後の症状
Normal, no symptoms (正常)	副作用は認められない。
Slight (軽度な反応)	軽度の運動機能低下、呼吸困難、腹腔刺激性の症状が認められる。
Moderate (中等度の反応)	腹腔刺激性、呼吸困難、運動機能低下、眼瞼下垂、下痢が明確に認められる。
Marked (著しい反応)	虚脱、チアノーゼ、振戦あるいは重度の腹腔刺激性、下痢、眼瞼下垂、呼吸困難が認められる。
Dead (死亡)	死亡

⑥ 病理解剖

観察期間終了後、全例をペントバルビタールナトリウムで麻酔し、放血致死させ、投与部位、脳、下垂体、甲状腺、心臓、胸腺、大動脈、気管、気管支、肺、肝臓、胆嚢、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上部、前立腺、精嚢を肉眼的に観察した。

C. 結果と考察

1. PMPC 処理 UHMWPE についての V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験

MPC ポリマー処理 UHMWPE 群では、

被検物質上面には細胞が接着せずコロニー形成はされなかったが、ウェル中に陰性材料である組織培養用プラスチックシートおよび陰性対照と同程度のコロニーが形成された。一方、陽性の標準材料 B である 0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルムを用いた場合にはコロニーは形成されなかった。(図 4 および表 10)。

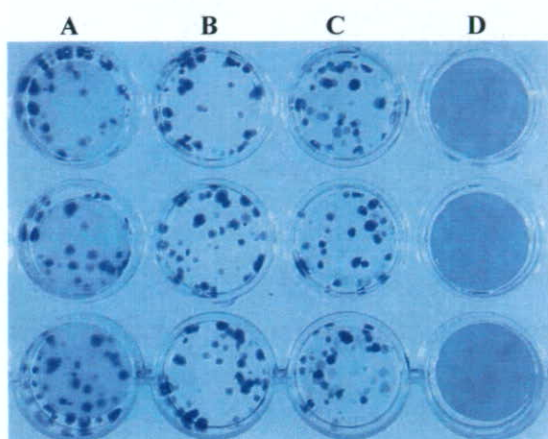


図 4. PMPC 処理 UHMWPE の V79 細胞を用いる接触法による細胞毒性試験

- A: P&C 処理 UHMWPE
- B: 陰性対照 (未処理ウェル)
- C: 組織培養用プラスチックシート (陰性対照)
- D: 0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルム (標準材料 B)

表 10 PMPC 処理 UHMWPE の V79 細胞における直接接触法による試験結果

物質名	コロニー/ウェル					相対コロニー形成率(%)
	1	2	3	平均 ± S.D.		
陰性対照	40	47	46	44.3 ± 3.8	100.0	
PMPC 処理 UHMWPE	53	45	39	45.7 ± 7.0	103.2	
組織培養用プラスチックシート (陰性材料)	41	42	49	44.0 ± 4.4	99.3	
0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルム (標準材料)	0	0	0	0.0 ± 0.0	0.0	

2. PMPC 処理 UHMWPE についてのウサギを用いた 90 日間関節腔内埋植による亜慢性毒性試験

① 一般状態

表 11 に、埋植したウサギ (90 日間)

のクリニカルサインを示す。被験物質埋植群の 1 例で埋植第 15 日から、対照物質埋植群の 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。

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な体重増減は認められなかった。

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、被験物質埋植群で対照物質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。

表 11 PMPC 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 ^{a)} 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 血液学的検査

被験物質埋植群において、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 12)。

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。

③ 血液生化学的検査

表 13 に PMPC 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。

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、被験物質埋植群の 1 例において、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、対照物質埋植群の 1 例では、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。

④ 病理学的検査

1) 器官重量

表 14 および 15 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

表 12 PMPC 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 ⁴ /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (x10 ⁴ /μL)
UHMWPE (control)	7 ^{a)}	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 ^{a)}	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 ^{a)}	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 13 PMPC 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 ^{a)}	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	Phospholipid (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 ^{a)}	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 ^{a)}	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