

#### 4. タンパク質吸着力測定

タンパク質を固定化したカンチレバーを AFM のフォースカーブ測定に使用し、シリコン基板上に作製した各ポリマーブラシ表面に対するタンパク質吸着力を評価した。Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> カンチレバー (OTR8、Veeco) にクロムの接着層 (3 nm) を介して金 (27 nm) をスパッタした。金スパッタカンチレバーを 1 mmol/L に調製した 11-mercaptopundecanoic acid のエタノール溶液に一晩浸漬させカルボキシル基末端自己組織化単分子 (SAM) 膜を作製した。同カンチレバーを 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (0.10 mol/L) と N-hydroxysuccinimide (0.05 mol/L) の水溶液に 30 分間浸漬した後、純水による洗浄後直ちに 1 mg/mL の濃度に調製したウシ血清アルブミンのリン酸緩衝溶液 (PBS、pH 7.4) に浸漬し、1 時間 37°C で静置した。PBS にて洗浄し、アルブミン固定化カンチレバーを得た。得られたアルブミン固定化カンチレバーは使用するまで 4°C の PBS 中で保存した。アルブミン固定化カンチレバーを使用したフォースカーブ測定を室温の PBS 中にてコンタクトモードで行った (図 3)。得られたアプローチカーブとリトラクトカーブの変位の差の最大値をタンパク質吸着力と定義し、各基板に対し 100 箇所程度の吸着力の平均値をアルブミンと基板とのタンパク質吸着力として定量した。

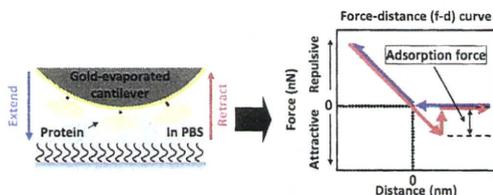


図 3. AFM のフォースカーブ測定を用いたタンパク質吸着力解析手法

#### C. 研究結果および考察

##### 1. ポリマーブラシ基板の精密構造評価

図 4 に各ポリマーブラシ基板の代表的な XPS チャートを示す。炭素原子の範囲における 285.0、286.5 および 289.0 eV のピークはそれぞれメタクリル酸骨格の中性炭素、エーテル炭素およびエステル炭素に由来する。PHEMA ブラシ表面を除く 4 種類のポリマーブラシ表面には窒素原子の範囲において、プロトン化されたアンモニウム基に由来するピークが検出された。さらに、PMPC ブラシ基板にはリン原子の範囲においてリン酸エステルに由来するピークが、PSBMA ブラシ基板には硫黄原子の範囲においてスルホン酸基に由来するピークが検出された。これらの結果はシリコン基板上にそれぞれのモノマーユニットに対応するポリマーブラシ構造が構築されていることを示した。

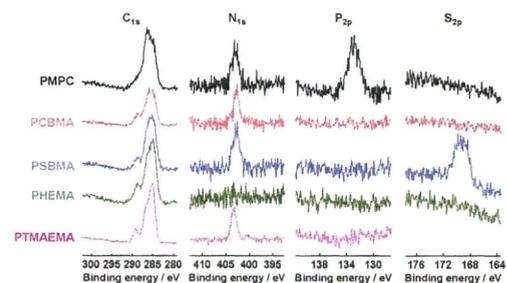


図 4. 各ポリマーブラシ基板の XPS チャート

図 5 に、グラフト層の乾燥状態のエリプソメトリー膜厚とポリマー鎖の数平均分子量の関係を示す。ターゲットの重合度を制御することにより 1-20 nm の範囲で膜厚を制御できた。図 5 から算出した各ポリマーブラシ層のポリマー鎖のグラフト密度は PMPC ブラシ基板で 0.26、PSBMA ブラシ基板で 0.48、PCBMA ブラシ基板で 0.67、PHEMA ブラシ基板で 0.79、PTMAEMA プ

ラシ基板で  $0.38 \text{ chains/nm}^2$  であった。これらの数値は、 $0.10 \text{ chains/nm}^2$  を越えており、基板表面に形成されたポリマーブラシ構造が高密度領域に達していることが示された。算出されたグラフト密度とポリマー鎖の断面積から表面被覆率を概算した結果、PMPC、PCBMA、PSBMA、PHEMA および PTMAEMA ブラシ基板においてそれぞれ、39、74、69、59 および 37 % であった。高密度領域に達している poly(methyl methacrylate) (PMMA) ブラシ基板における PMMA 鎖の被覆率は 30 % 程度であると報告されている。このことから、今回作製されたポリマーブラシ基板が高密度領域にあることが分かった。

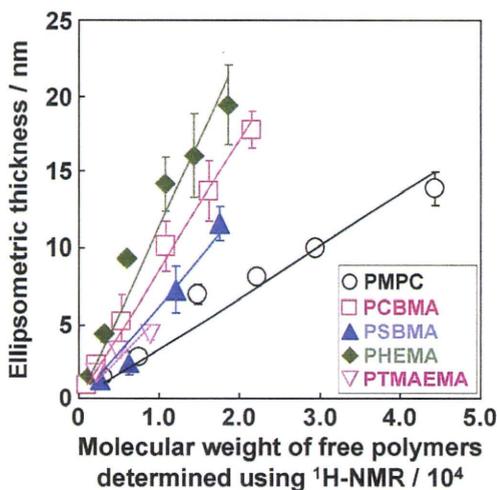


図 5. グラフト層のエリプソメトリ膜厚とフリーポリマーの分子量の関係

図 6 にポリマーブラシ表面の乾燥状態の表面形状を示す。BrC10TCS 固定化シリコン基板の RMS 値は  $0.7 \text{ nm}$  であり非常に平坦であったが、未修飾のシリコン基板 (RMS 値:  $0.3 \text{ nm}$ ) より多少の増加が見られた。一方、各ポリマーブラシ基板には明確な凹凸構造が見られた。しかしながら RMS 値は  $1.0 \text{ nm}$  程度であり比較的平坦な表面であることが分かった。また、同程度のグラ

フト層の厚さであれば、化学構造に関わらず表面粗さに大きな差異がないこともわかった。この結果により、タンパク質との相互作用の差異に影響を与える表面特性として、表面粗さの寄与は少ないことが示唆された。

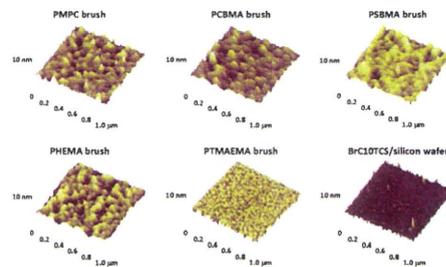


図 6. ポリマーブラシ層の表面形状

## 2. ポリマーブラシ基板の特性評価

図 7 に各ポリマーブラシ表面に対する水の静的接触角とグラフト層のエリプソメトリ膜厚との関係を示す。未修飾のシリコン基板の静的接触角は  $10^\circ$  以下であったが、BrC10TCS を固定したシリコン基板の静的接触角は  $80^\circ$  程度で疎水的であった。一方、ポリマーブラシ基板の静的接触角は、膜厚が小さい場合でも BrC10TCS 固定化基板より親水的であった。これは多少の親水的ポリマー鎖の存在で表面の親水性が向上することを意味する。グラフト層のエリプソメトリ膜厚に対する静的接触角の依存性は、モノマーユニットの化学構造によって異なった。PMPC および PCBMA ブラシ表面に関してはグラフト層の厚さの増加に伴い接触角が急激に減少し、 $10^\circ$  付近で平衡に達した。同じ双性イオン型構造を有する PSBMA ブラシ表面に関しては、グラフト層の膜厚の増加に対して徐々に接触角が減少した。一方、非イオン型の PHEMA ブラシ基板に関してはグラフト層の厚さに非依存的に  $50^\circ$  程度の接触角であった。カチオン型の PTMAEMA ブラシ基板に関しては、グラ

フト層の厚さが 5.0 nm 程度までは接触角が  $40^\circ$  を超えたのに対し、それ以上の膜厚では  $40^\circ$  以下になった。これらの結果は BrC10TCS の疎水性とそれぞれのポリマーの水への溶解性が関係していると考えられる。小さい膜厚のポリマーブラシ基板では一部 BrC10TCS が露出し、そのため高い接触角を示したと考えられる。PMPC および PCBMA は水溶性のポリマーであり、そのためそれらのポリマーブラシ基板は非常に高い親水性を示したと考えられる。PSBMA は塩を含む水溶液にのみ可溶であることが関連していると考えられる。PHEMA は非水溶性のポリマーであるためそのポリマーブラシ表面は他と比較して疎水性を示したと考えられる。

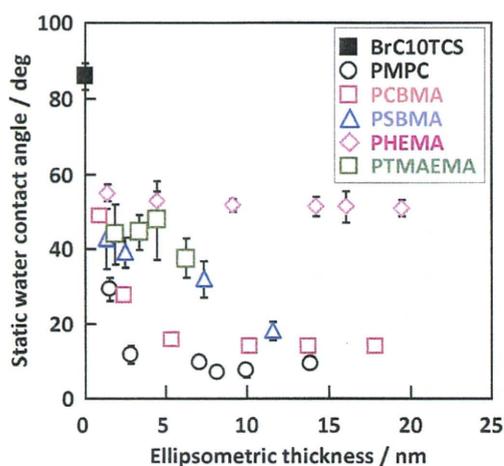


図 7. ポリマーブラシ基板に対する水の静的接触角とグラフト層のエリプソメトリー膜厚の関係

図 8 に膜厚が 5 nm 程度の各ポリマーブラシ基板の動的接触角の結果を示す。前進接触角は図 7 で示した水の静的接触角と同様の数値を示した。特に PHEMA および PTMAEMA ブラシ表面は双性イオン型ポリマーブラシ表面と比較して、高い前進接触角を示した。しかしながら、PTMAEMA ブラシ表面は大きなヒステリシスを示し、その後退

接触角は双性イオン型ポリマーブラシ層と同様に  $20^\circ$  前後となった。一方、PHEMA ブラシ基板も大きなヒステリシスを示し後退接触角が  $30^\circ$  まで低下した。バイオマテリアルが水環境下で使用されることを考慮すると、双性イオン型およびカチオン型ポリマーブラシ表面ではタンパク質との相互作用の差異を考慮する上で、表面自由エネルギーの寄与が小さいことが示唆された。

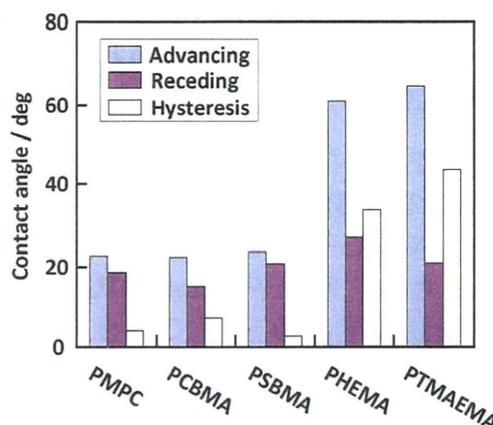


図 8. ポリマーブラシ基板の水に対する動的接触角

図 9 に膜厚が 5 nm 程度の PMPC ブラシ層近傍の水分子の磁化強度の回復を示す。純水の T1 値がおよそ 3000 ms であるのに対し、図 9 から算出された PMPC ブラシ層近傍の水分子の T1 値は 100 ms 程度であった。水分子の運動性と T1 値の間には正の相関が存在するため、この結果はガラスビーズ表面に存在する PMPC ブラシ近傍の水分子の運動性が純水と比較して低いことを示す。これは PMPC ブラシ層周辺に存在する水分子が PMPC 鎖と相互作用しているためであると考えられる。図 10 に膜厚が 5 nm 程度の各ポリマーブラシ層近傍の水分子の T1 値を示す。ビーズに固定化された BrC10TCS 近傍の水分子の T1 値は各ポリマーブラシ層近傍の水分子の T1 値と比較して大

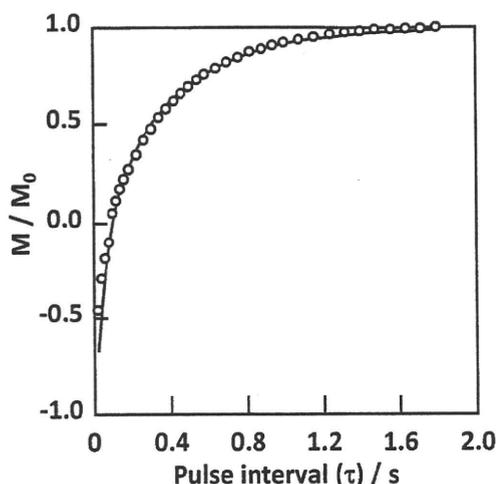


図 9. PMPC ブラシ層近傍の水分子の磁化強度の回復

きな値であった。自己組織化単分子表面はそれ自体に水分子を含むことがなく、さらに BrC10TCS 表面が疎水性であるため、水分子は BrC10TCS 層近傍で吸脱着を繰り返していると考えられる。このため高い水分子の運動性を示したと考えられる。一方、カチオン型の PTMAEMA ブラシ層近傍の水分子の T1 値は他のポリマーブラシ層近傍の水分子の T1 値と比較して小さな値であった。これはカチオン性の PTMAEMA 鎖に水分子が強く相互作用しているためであると考えられる。今回の実験条件下では、双性イオン型および非イオン型のポリマーブラシ層近傍の水分子の T1 値には有意な差がなかった。測定温度や湿度などを変化させ、外部環境の動的変化に対する T1 値の依存性を評価する必要があると考えられる。

### 3. ポリマーブラシ基板に対するタンパク質吸着力

図 11 にアルブミン固定化カンチレバーを各ポリマーブラシ層の 100 箇所程度に接近/離脱させた際に得られたタンパク質吸着力のヒストグラムを

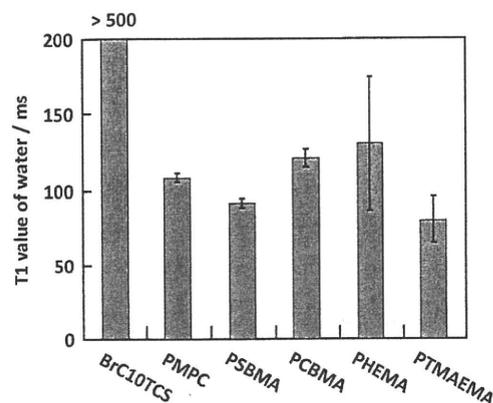


図 10. 各ポリマーブラシ層近傍の水分子の T1 値

示す。疎水性の BrC10TCS 固定化基板では、2.0 から 4.5 nN の広い範囲にタンパク質吸着力が検出され、その平均値は 3.0 nN 程度であった。この結果は BrC10TCS 固定化基板に吸着したアルブミンが表面からほとんど脱離しないこと示唆した。一方、5 nm 程度の膜厚を有する各ポリマーブラシ基板に対するタンパク質吸着力は BrC10TCS 固定化基板と比較して有意に抑制された。カチオン型の PTMAEMA ブラシ基板に対するタンパク質吸着力は 1.7 nN 程度と他のポリマーブラシ基板と比較して高い値となった。この結果は、カチオン型の表面がタンパク質と強い相互作用を持つことを示す。先に述べたように PTMAEMA ブラシ周辺の水分子は低い運動性であるため、タンパク質周辺の運動性の低い水分子と交換され、タンパク質が材料と直接相互作用を持つようになると考えられる。非イオン型の PHEMA ブラシ基板に対するタンパク質吸着力は 0.7 nN であり、比較的高い数値であった。これは PHEMA ブラシ基板が水中で比較的疎水性であることに関連すると考えられる。双性イオン型の PMPC、PCBMA および PSBMA ブラシ基板に対するタンパク質吸着力はそれぞれ 0.2、0.4 お

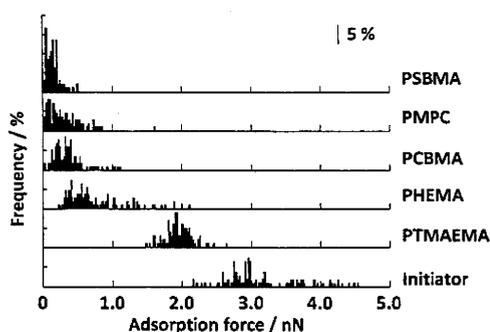


図 11. 各ポリマーブラシ基板に対するアルブミンの吸着力

よび 0.1 nN であり、特に PMPC および PSBMA ブラシ基板に関しては、BrC10TCS 固定化基板に対するタンパク質吸着力の 10 %以下の値にまで抑制された。つまり、これらの表面にはタンパク質がほとんど相互作用を持たないことがわかった。先に述べたように現在、カチオン型の PTMAEMA ブラシ層以外のポリマーブラシ層近傍の水分子の運動性には有意な差が認められていない。これについては今後の課題として残された。

#### D. 結論

構造明確なポリマーブラシ表面を様々な化学構造を有するモノマーユニットを用いて作製しバイオマテリアルのモデル表面とすることで、表面の水和状態およびタンパク質の相互作用力をそれぞれ  $^1\text{H-NMR}$  測定および AFM のフォースカーブ測定により解析した。カチオン型の表面では水分子の運動性が抑制されており、タンパク質との相互作用が大きかった。一方、ホスホベタインやスルホベタイン構造を持つ双性イオン型の表面は、タンパク質との相互作用力がほとんど検出されず高い生体親和性を有することがわかった。しかしながらその表面の水和状態の詳細な分析には至らず、水分子の運動性が生体親和性に果たす

役割については明らかにされなかった。しかしながら本研究の遂行により材料表面におけるタンパク質吸着挙動を新たな観点から理解することが可能となり、タンパク質非吸着表面を創製する新しい分子設計の指標を提示できると確信できる。

#### E. 研究発表

1. Yuuki Inoue, Tomoaki Nakanishi, Kazuhiko Ishihara, "Adhesion force of proteins against hydrophilic polymer brush surfaces", *React. Funct. Polym.* (2010) 71 (350-355).
2. Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Reduction of Protein Adsorption on Well-characterized Polymer Brush Layers with Varying Chemical Structures", *Colloid Surf. B: Biointerface* (2010) 81 (350-357).
3. Toru Moro, Yoshio Takatori, Masayuki Kyomoto, Kazuhiko Ishihara, Saiga, Kouzo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi, "Surface Grafting of Biocompatible Phospholipid Polymer MPC Provides Wear Resistance of Tibial Polyethylene Insert in Artificial Knee Joints", *Osteoarthritis Cartilage* (2010) 18 (1174-1182).
4. Sang Ho Ye, Carl A. Johnson Jr, Joshua R. Woolley, Hironobu Murata, Lara J. Gamble, Kazuhiko Ishihara and William R. Wagner, "Simple Surface Modification of a Titanium Alloy with Silanated Zwitterionic Phosphorylcholine or Sulfobetaine Modifiers to Reduce Thrombogenicity", *Colloid Surf. B:*

Biointerface (2010) 79 (357-364).

5. Masayuki Kyomoto, Toru Moro, Yasuhiko Iwasaki, Fumiaki Miyaji, Hiroshi Kawaguchi, Yoshio Takatori, Kozo Nakamura, and Kazuhiko Ishihara, "Lubricity and Stability of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) Polymer Layer on Co-Cr-Mo Surface for Hemi-arthroplasty to Prevent Degeneration of Articular Cartilage", *Biomaterials* (2010) 31 (658-668).

6. Kimiaki Takami, Junji Watanabe, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, "Spontaneous Formation of a Hydrogel Composed of Water-soluble Phospholipid Polymer Grafted with Enantiomeric Oligo(lactic acid) Chains", *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 22(1) 77-89 (2011).

7. Hyung Il Kim, Kazuhiko Ishihara, Seungbok Lee, Ji-Hun Seo, Hye Young Kim, Dongwhan Suh, Min Uk Kim, Tomohiro Konno, Madoka Taka... Jeong-Sun Seo, "Tissue response to poly(L-lactic acid)-based blend with phospholipid polymer for biodegradable cardiovascular stents", *Biomaterials* 32(9) 2241-2247 (2011).

分担研究課題名  
生体適合性高分子の合成と水の構造解析

研究分担者 田中 賢 山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻

研究要旨

生体適合性高分子の設計および生体適合性発現機構の解明を行うために、メトキシ基やエトキシ基などのアルコキシル基を有する（メタ）アクリレートの合成を行い、熱分析により水和構造を調べた。中間水の構造に特徴が見られることが分かった。

A. 研究目的

医療製品が血液・組織と接触すると、直ちに水やタンパク質が材料表面に吸着する。また、生命現象の反応場の観点から水分子に着目すると、この水分子はタンパク質や細胞の接着形態や機能発現の場を形成しており、この水分子の構造や運動性が医療用材料に要求される生体適合性に大きな影響を与えると考えられる<sup>1,2)</sup>。本研究では、優れた生体適合性を示す poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)<sup>3)</sup> の類似体を合成し、水の構造を調べた。

B. 研究方法

PMEA の類似体として、poly [2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate] (PEEA) などのアルコキシアルキル基を有する（メタ）アクリレートを合成した（図1）。また、示差走査熱量計（DSC）を用いて、飽和含水した高分子の水の構造を調べた。飽和含水量と各転移における熱量からポリマー中に存在する 3 種類の水の量を以

下の式に従い求めた。なお、本研究では、ポリマーに飽和含水した水のうち、Non-freezing water（不凍水）は、-100℃においても凍結しない水、Freezing bound water（中間水）は、低温結晶化（CC）する水、Free water（自由水）は、0℃付近で融解する水としてそれぞれ扱った<sup>4,5)</sup>

飽和含水量(EWC) =  $W_{nf} + W_{fb} + W_f$ ,  
 $W_{fb} = \Delta H_{cc} / C_p$ ,  $W_f = (\Delta H_m / C_p) - W_{fb}$ ,  
ここで、 $W_{nf}$ : 不凍水量、 $W_{fb}$ : 中間水量、 $W_f$ : 自由水量、 $C_p$ : 融解潜熱、 $\Delta H_{cc}$ : 低温結晶化（CC）した水におけるエンタルピー変化量、 $\Delta H_m$ : -15～0℃で融解した水におけるエンタルピー変化量とした。

C. 研究結果

DSCを用いて、含水したPEEA中の水の構造を調べた。その結果、-100℃からの昇温過程で水のコールドクリスタリゼーション（CC）に由来する発熱ピークが観

測された(図2)。PEEAおよびその類似体は下限臨界溶液温度(LCST)を有することがわかり、生体適合性と温度応答性を併せ持つ高分子であることが分かった。また、CCの出現直後に六方晶の氷晶の形成がX線回折より観測されたことから、このCCは、低温での氷の結晶形成現象であることが明らかになった。CCは中間水として定義され、生体適合高分子の代表例であるリン脂質(MPC)ポリマー、PMEAなどのメトキシ基やエトキシ基などのアルコキシル基を有する(メタ)アクリレート、ポリテトラヒドロフルフリルアクリレート(P THFA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリビニルメチルエーテル(PVME)、生体高分子であるゼラチンやアルブミン、チトクロームCなどのタンパク質、ヒアルロン酸、アルギン酸などの多糖にも共通して観測されることを見出した。なお、時間分解赤外分光<sup>6)</sup>や固体NMR<sup>7)</sup>測定の結果からもCCの存在が確認できる。一方、生体適合性の劣るポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)などの高分子にはCCとして観測される中間水は観測されなかった。

#### D. 考察

タンパク質や多糖などの生体成分は血液中で水和殻を形成し安定化されているが、材料表面の不凍水などが直接この水和殻に接触し、これを攪乱あるいは破壊すると、生体成分の材料表面への吸着・活性化の引き金となると考えられている。生体適合性表面では上述の中間水が、生体成分の水和殻と材料表面の不凍水層の間に存在し両者が直接接触することを阻害するため、異物認識が起きないと推察される。中間水は生体成分の水和層を破壊

するほどの特異な水素結合構造は有していないものの、高い分子運動性を有する高分子鎖と弱く相互作用した水であるため、自由水と不凍水との界面に安定に存在できると考えられる。高分子鎖の高い運動性(高分子のダイナミクス)と高分子と水の分子間相互作用とのバランスが機能発現に重要と考えられる。

#### E. 結論

優れた生体適合性を示すPMEAの類似体として、アルコキシルアルキル基を有する(メタ)アクリレートを合成した。低温結晶形成として観測される中間水の構造に特徴が見られた。

#### F. 研究発表

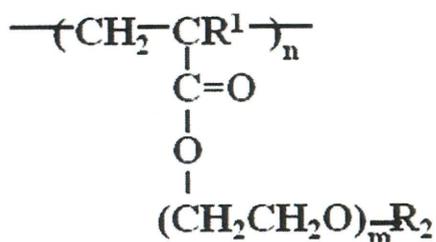
- 1) 田中 賢. 2次元・3次元構造を有する足場材料による細胞の接着・機能制御. 第32回日本再生医療学会総会(2011年3月・東京)

#### G. 参照資料

- 1) Tsuruta T. Contemporary topics in polymeric materials for biomedical applications: Adv Polym Sci, 126:1-51(1996).
- 2) 石原一彦, ポリマーバイオマテリアル, コロナ社, 2009.
- 3) Tanaka M, Motomura T, Kawada M, Anzai T, Kasori Y, et al. Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)- Relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface. Biomaterials, 21:1471-1481(2000).
- 4) Tanaka M, Mochizuki A, Ishii N, Motomura T, Hatakeyama T. Study on blood compatibility of poly(2-methoxyethyl acrylate)- Relationship between water structure and platelet compatibility in poly(2-methoxyethyl acrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate). Biomacromolecules, 3:36-41(2002).
- 5) Tanaka M, Mochizuki A. Effect of water structure on blood compatibility- thermal analysis of

water in poly(meth)acrylate. J Biomed Mater Res A, 68:684-695(2004).

- 6) S. Morita, M. Tanaka, Y. Ozaki, Time-Resolved In-Situ ATR-IR Observations of Water Sorption Process into a Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) Film, Langmuir, 23: 3750-3761(2007).
- 7) Y. Miwa, H. Ishida, H. Saitô, M. Tanaka, Mochizuki, Network structures and dynamics of dry and swollen poly(acrylate)s. Characterization of high- and low-frequency motions as revealed by suppressed or recovered intensities (SRI) analysis of  $^{13}\text{C}$  NMR, Polymer, 50:6091-6098(2009).



**R<sup>1</sup> : H or CH<sub>3</sub>**  
**R<sup>2</sup> : CH<sub>3</sub> or C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>**  
**m : 2 or 3**

図1 メトキシ基やエトキシ基などのアルコキシル基を有する(メタ)アクリレート

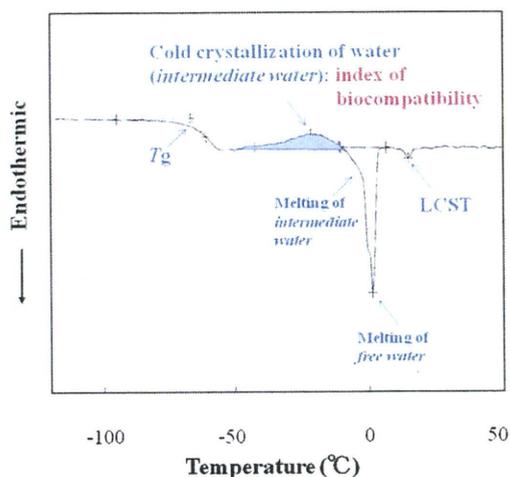


図2 含水 PEEA の DSC カーブ

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

分担研究題名

医療機器の分類に関する研究

研究分担者 横井 英人 香川大学医学部附属病院医療情報部教授

研究協力者 中崎 知道 日本医療機器産業連合会

研究要旨

国際的に使用されている医療機器の分類命名法である GMDN の現状について、イタリア・オーストラリアの規制当局に於ける利用方法を調査した。イタリアは独自の医療機器のコードを開発し、GMDN とのリンクを準備した。オーストラリアは、2002 年時点での GMDN を利用して、規制用のコードとし、以後必要に応じて、オーストラリアのコード体系との整合性を確認した上で GMDN のコード追加に対応している。また、本邦の規制に於ける有用な使用方法を検討する上で、他の研究にて行われている、医療機器の不具合用語集の開発過程に於いて JMDN の使用方法を調査した。集計・分類に用いて、その安全対策上の妥当性を認識したが GMDN の持つ資産を全て使ったというわけではなかった。

A. 研究目的

国際的に使用されている医療機器の分類命名法である GMDN の現状を調査し、本邦の規制に於ける有用な使用方法を検討する。

本研究は、直接に患者を対象とした研究ではない。また患者個人の情報を扱っていない。

B. 研究方法

これまで、他の研究で続けられてきた、欧米の各規制当局に於ける GMDN の利用現状、特に規制に関する情報システムの利活用の現状の調査を継続する。また、GMDN から派生した JMDN を医療機器不具合報告のための用語集作成のために使用している研究の状況を調査し、その粒度の妥当性を検証する。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

1. イタリア規制当局に於けるデータバンク運用について

研究協力者により、2010 年 7 月にイタリアの規制手法と用いられた情報システムについての調査が行われた。

Databank of Medical Devices と呼ばれるシステムは、イタリアに於ける医療機器の重要な情報を収集し、管理するためのシステムとして構築された。2010 年 7 月現在、イタリアで市販さ

れている医療機器(キット・組み合わせ医療機器を含む) 283,297 件が登録され、そのうち National Health Service (NHS)に関連する 65% が RDM (Repertorio dei Dispositivi Medici)で有効である。このようにして構築されたデータバンクはヨーロッパ全体のデータバンク EUDAMED と統合することが可能となる。

登録される内容は、

- ① Manufacturer (Designation, Tax ID number, VAT Number, Registered head office, Branch offices, Legal representative, Contact information, Those responsible for supervision)
- ② Device data (General information regarding the medical device (Type of device, Classification in the National Classification of Medical Devices etc.), Specifications, Other medical devices necessary for its functioning)
- ③ Documentation (Labeling, Instructions for use, Specifications for the medical device, Scientific bibliography)
- ④ EC certification data (Issued /extended / renewed EC certifications, Rejected EC certifications, Suspended EC certifications, Revoked EC certifications)

となっている。これにより、規制の現状を、種々の条件で集計検索し、把握することができる。

RDM で用いられるデバイスのコード The hierarchical structure of the National Classification of Medical Devices (CND)は 2003 年に法律にて規定された。統一されたクラスとサブクラスを用いる分類を確立するように求められた。CND は以下の利用法を想定されている。

・各レベルに於ける NHS の調達の評価

・医療機器の参照価格の設定

・ポリシーの明確化

CND は英数文字 13 桁で規定される。

[A] | [#][#] | [#][#],[#][#],[#][#],[#][#]

・Level 1: Categories

・Level 2: Groups

・Level 3 to 7: Types

CND は National Commission for Medical Devices (CUD)により、開発・メンテナンスが行われている。CND メンテナンスに於いては、他の用語集・分類とのリンクも検討することとされており、特に GMDN には注意を払っている。GMDN に於ける Preferred Terms は医療機器に於ける識別に使用できるものであるとの認識から、CND とリンクすることとした。

その結果、

- ・ GMDN と CND の最下層とのリンクが可能であったもの: 7251
- ・ GMDN とリンクできなかった CND: 2654
- ・ 中間レベルの CND とリンクできた GMDN: 1386

とのことであった。このリンクについて CUD は RDM の登録に際して業者からの要望があれば継続的に更新することとしている。

## 2.TGA の動向調査

市販前業務に於ける GMDN の利用方法

TGA はスナップショットである GMDN-2002 版 (GMDN Agency は 2003 年まで年一回 CD-ROM によってデータを提供していた)を ARTG(Australian Register of Therapeutic Goods、市場に流通する医薬品・医療機器のデータベース)にコピーし、市販前の規制業務に使用している。

通常、国際コードを自国内のデータベースで使用するときには、そのアップデートに対し

て、可及的速やかに追従する方法がとられることが多い。しかし、現在 TGA は、そのようにはしておらず、必要に応じてコードの追加を行っている。その理由は以下に述べるところである。

- TGA 担当者によれば 2003 年までは、GMDN の5桁コードの再使用がなされていた。
- 2003 年以降は同じコードでも名称と定義の変更が行われている。
- TGA は granularity(粒度化)により作成された Template Term(TT)を、Class I 医療機器の市販前規制(届出)に使用していた。

したがって、これを Obsolete にされると過去データとの整合性がとれなくなるので、必然的に過去のコードを使わざるを得ない。(※1)

オーストラリアでの薬事申請・届け出のうちの9割は、海外(特に欧州)で薬事承認等を受けたものである。CE マークを取得するときには、GMDN を選択する必要がある(ただしドイツでは現在 GMDN を使用していない)。したがってオーストラリアに申請・届け出をした医療機器は、既に概ね適切な GMDN が選択されているはずである。市販前登録される医療機器の GMDN が ARTG システムになかった場合は、TGA 職員の人手により GMDN website を確認し、そのコードのデータを ARTG に登録している。この時点で、上記の問題を念頭に GMDN データの追加/修正/削除の可否を判断する。

登録を行う際に使用する GMDN コードはオーストラリア政府が ARTG システム内で管理しているものなので、オーストラリアのスポンサー(オーストラリアへ医療機器の登録・申請を行う者、GHTF ガイダンスにおける Manufacturer、

Authorized Representative、Importer に該当する)はライセンス料を GMDN Agency に直接支払う必要はない。

IVD については Class 1, 2, 3 に於いては Collective Term (CT)による登録を行い、Class 4 (high public health risk)のみが Preferred Term (PT)での申請を必要とする。(※2)

補足 ※1

粒度化(granularity:カンマをつけて次のレベルの用語を追加することにより概念作成を行う手法。特に Template と呼ばれる基本的な用語を使用したコードについては、慣用的に使用される用語とは趣の異なる表記となっている。: 例 Pacemaker, cardiac, external, invasive)

補足 ※2

GMDN Agency は TT、CT を医療機器の「認識(Identification)」には使用しない事を要求している。しかし TGA は ARTG システムにおいてクラス I 医療機器に対する、TT の有用性(PT レベルの詳細さを必要としない)を理解したために、クラス1~3の IVD に対しても CT を使用する事を決定した。

そもそも GMDN とは規制当局間のデータ交換が当初の目的であり、各規制当局の nomenclature を集めてハーモナイズすることによりコードが開発された。開発までは CEN が資金を提供し各国の専門家が作業を担当していたが、メンテナンスに関しては GMDN Agency という Non-profit company を作った。

一方、Non-profit company のビジネスモデルに於いてはユーザー数の拡大が必要とされ、ライセンス料を Manufacturer のみでなく、User facility(医療機関を想定)からも取ることとした。User facility での利用方法は、在庫管理(通常

の在庫管理だけではなく、手技に使用される機器の確認も含む)を想定しており、医療に必要な物品であれば、医療機器でないものにもコードが振られるようになった(例えば、Toilet sheet)。それに併せて、医療機関における慣用表現に名称をあわせるようにしてきた。

現在の GMDN Agency は TT を Obsolete にして、TT を元に「粒度化」によって作成していた用語に関して、その下位の PT の名称を慣用表現へ変更する方向となっている。この方針転換が、TGA の ARTG における利用方法と相容れない状況を作った原因の一つである。(「粒度化」の使用は階層構造の推定を使用者に可能とし、同階層の並列データから検索用ツールを用いる事なく適切な PT を選択する事が出来る。結果として GMDN Agency は「粒度化」の使用を止める事により、CT を使用した検索用ツールの開発を余儀なくされた。)

#### 安全対策に於ける GMDN その他のコードの利用現状

なお、市販後安全対策に於いては、スポンサー若しくは使用者からの有害事象報告を紙で受け取り、TGA 内部でデータベースに登録している。登録に際し、医療機器においては GMDN を使用している。ただし、コードの登録のみで、CT を用いてのグループ化を行っての処理作業などは行っていないとのことであった。GMDN 専門家の中崎氏によれば、CT を用いれば同様の機能・性質を持つ医療機器に於ける有害事象の分析が可能となり、有益な使用方法が期待されるとのコメントが TGA 担当者に伝えられた。

データベース登録時、有害事象は ISO(19218)のコードを用いてコーディングされている。これも TGA 職員により行われ、統計処

理・検索に用いられているとのことである。

日本の行政・業界の両方から ISO のコードを報告自体に用いて使用するには粒度が粗すぎるとの見解が出ていることについて、TGA 職員から異論はなかった。

#### 本邦国内に於ける GMDN(JMDN)の利用促進に関する試み

我々は、医機連と共同で、医療機器安全性報告に於ける不具合用語の収集を行った。医療機器の不具合は、縫合糸から MRI といった多様性ゆえに、包括的な表現方法でまとめると、実際の報告で必要な粒度の用語を選択することが大変難しくなるので、業界ごとに、代表品目を設定し、それぞれについて用語を収集した。また代表品目と特徴が類似し、同じ不具合用語が適用できると判断された機器を類似品目として列挙した。その結果、品目数としては、現在ある一般的名称の数 4065 に対して 1994 (49%) をカバーしたこととなった。しかし、ここから外れた医療機器には既に使用されなくなっているもの、ほとんど不具合報告が発生していないものが多数存在し、実際の不具合報告(平成 21 年度)に於いては JMDN コードレベルでの集計を行ったところ、84%をカバーしていた。更に旧法下で承認された機器で、未だ JMDN が正式にはふられていない機器が使用されている例の報告があったが、現在のところ、何らかの一般的名称・JMDN への読み替えが可能であるとの見解を得ている。今回の検証では GMDN の理念を汲んだ適用までは至らなかったが、種々の集計作業に於いて JMDN コードを有効に利用することが可能であった。JMDN は GMDN から派生したコード体系であることから、更に今後、医療機器のグルーピングに利用できる GMDN の Collective Term

を使用することで、個別的な一般的名称のみでなく、グルーピングされた機器としての扱いが容易になることが予想される。また、前述の医療機器不具合用語集の開発作業を継続するに当たり、過去に報告されている品目を業界ごとに精査し、必要な品目の用語を整備することで、より有効な用語集にすることが可能となると推察される。

#### D. 考察

##### 1. コードの意味性について

コードとは、用語集などを作成した場合に、それぞれの用語にふられた番号や記号であり、その用語を一意に表すことができる。ID (identifier) と表現されることもある。現在、JMDN は GMDN のコードを元にして派生させている。JMDN のコードは8桁から成り、上の5桁は GMDN と同一としている。ただし一部の品目については、分類が一对一の対応になっていないことがあり、一つの JMDN (一般的名称) に複数の GMDN が相当していることがある。

用語集・コードの作成・維持に際しては、そのコードに意味を持たせるか否かで意見が大きく分かれる。情報工学的見地から考えると、コードに意味を持たせた場合、コードの生成規則 (桁数や、使用できる文字の制限など) により、表現できる情報量に制限が発生する。つまり表現したい情報量がその制限を超える危険性を孕むこととなる。したがって、コンピュータシステム上で運用することを前提とした近年の用語集・コードに於いては、コードはユニーク性のみが保証された背番号としての意味しか持たず、分類に必要な属性情報などは、すべてコードに紐づけられたデータベースに於いて処理されることとなる。

このようにコードに意味を持たせない用語集

の例として、薬事の分野では医薬品副作用の用語集 MedDRA が挙げられる。MedDRA のコードは、登録された順番にふられた背番号として扱われており、分類などに用いる上下関係 (軸) を表現するには、親のコードと子のコードを列記したテーブルが用いられる。このテーブルは、情報工学的にはいわゆる正規化されたデータベース構造である。しかし、そのテーブルだけを見ても、単なるコードの羅列があるだけなので、このテーブルをコンピュータによりデータの配列を見やすく表示したり、その配列を考慮して検索をかける仕組みがないと使用できない。つまり、コンピュータの存在を前提としているとはいえ、コンピュータがなければ全く使用に耐えないコードであり、コンピュータ使用を前提にするか否かで、方針は別れることとなる。MedDRA の場合、上記のテーブルを再構成して表示し、検索にも対応するソフトウェアの提供が行われている。

一方、コードに意味を持たせた場合、コードを見ることで、そこに表現されている意味を人間が直接解釈できるので、慣れた使用者にとってはコンピュータへの依存が少ない状態で迅速な処理ができる。また、コンピュータで検索をするときにも、簡易的な操作 (例えば、上5桁が同一であるコードを検索する、などと言った通常の表計算ソフトで行える操作) で処理が可能となる。

また、今般、TGA で指摘されたような、コードの再使用など、データのユニーク性が保証されていない場合には、何らかの意味情報に基づき、処理をせざるを得ないケースが発生することも否定できない。言い方を変えると、コードの再使用を完全に排除することや、コード間の関係性 (上下関係など) を示すテーブルに於いて論理的に整合を行うことを、システムが保

証できないと、使用者は安心してコードを使用することができないと考えられる。

研究分担者は前述した、不具合用語集の開発時に、用語集ハンドリングシステムを開発した。同システムは、用語集開発・メンテナンスに有効な仕組みであると自負しているが、上記のような用語集・コードの品質管理に寄与する仕組みがあり、またこれが標準的に利用できる環境がないと、上記のような意見対立は続くと考えられた。

## 2.規制に於ける GMDN の有用性

GMDN は本来、システムチックに分類概念を整理する仕組みを持つ (Granularity) を持っている優れたコード管理体系である。この方法はアメリカで開発された医療用の用語集 SNOMED (Systematized Nomenclature of Medicine) と共通する。しかし、そのようにして論理的に生成された概念は、改めて医療現場もしくは医療機器業界内で使用されている一般的な用語との連関を後から追加する必要があり、一般的な使用者からはむしろ使いにくい印象を持たれてしまう。

グローバル企業による市場占有率が高いとはいえ、中小企業が多くを占める国内産業振興も視野に入れなくてはならないのが、日本の医療機器分野の現状である。然るに、情報システム的な見地からの統一運用に関しては、国内の中小企業が使用しやすい環境の整備と、使用することのメリットが理解されやすいユーザーケースの検討が必要である。

今回調査したイタリアとオーストラリアの規制当局のケースは、程度の差はあるものの、規制用のコードは独自にメンテナンスして運用している。この点は日本の JMDN も同様で、GMDN に立脚しているという点でも一致している。た

だ、日本の場合は明確に GMDN とのリンクを謳っているわけではなく、またそのための組織も存在しない。GMDN 自体、多様な医療機器の現状に合わせ、進化をしており、この資産を利用することには意義がある。その場合には、スタンスの明確化と受け皿となる組織の設定が必要となるであろう。

仮に国際的な命名法であっても、その規制への利用に際しては、各国の規則・ポリシーに基づいて一定のモディファイが必要となり、GMDN をそのまま使わなくてはならないという考えを持つ必要はない。現状の一般的名称の運用方法を継続しながら、GMDN を利用する方法は十分に考えることが可能である。

## E.結論

GMDN の使用形態を、他国の規制当局の規制方法と合わせ、調査を行った。GMDN の持つ国際的に統合された概念を用いることによる情報統合の有用性と、各国の個別性に立脚した運用が抱える問題を認識した。国内に於ける他の厚労科研の研究結果を鑑み、GMDN 利用に関する今後の展望を検討した。

## F.研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G.知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号・ページ・出版年
Matsuoka, A, Matsuda, Y, Kaniwa, M.	Needle fibers of an azo-dye mixture induce polyploidy in a Chinese hamster cell line CHL.	Bull. Natl. Inst. Health Sci.	128, 65-70 (2010)
松岡厚子	In vitro培養ヒト間葉系幹細胞の細胞遺伝学的安全性評価法に関する研究	国立医薬品食品衛生研究所報告	128, 50-57 (2010)
R. Nakaoka, Y. Yamakoshi, K. Isama, T. Tsuchiya	Effects of surface chemistry prepared by self-assembled monolayers on osteoblast behavior	J. Biomed. Mater. Res. A	94, 524-532(2010)
B. Hexig, K. Isama, Y. Haishima, Y. Inoue, T. Tsuchiya, T. Akaike	Self-organization of the compositional gradient structure in hyaluronic acid and poly(N-isopropylacrylamide)	J. Biomater. Sic. Polym. Ed.	21, 1957-1970(2010)
澤田留美、山田貴史 土屋利江、松岡厚子	ヒト間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析 — 無血清培地を用いた <i>in vitro</i> 培養期間中の遺伝子発現の変化について—	薬学雑誌	130(10), 1387-1393 (2010)
迫田秀行、石川格 脇谷滋之、天正恵治 佐藤道夫、松岡厚子	人工関節用超高分子量ポリエチレンのフラクトグラフィに関する基礎的研究	臨床バイオメカニクス	31, 187-191(2010)
石川格、迫田秀行 菅野伸彦、松岡厚子 土屋利江	光学式3Dデジタイザによる抜去人工股関節 UHMWPEライナーの摩耗測定	臨床バイオメカニクス	31, 299-304 (2010)
Sakoda, H., Ishikawa, I., Jung, D. Y., Wakitani, S., Tensho, K., Sato, M. and Tsuchiya, T.	Direct evaluation of fatigue property of ultra-high molecular weight polyethylene components of retrieved knee implants using small specimens.	Strength, Fracture and Complexity	6, 103-114 (2010)
迫田秀行、石川格 松岡厚子、西井孝 菅野伸彦	破損したバイポーラ型人工骨頭の不具合要因分析	日本人工関節学会誌	40, 550-551 (2010)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号・ページ・出版年
Yuuki Inoue, Tomoaki Nakanishi, Kazuhiko Ishihara	Adhesion force of proteins against hydrophilic polymer brush surfaces	React. Funct. Polym.	(2011) 71 (350-355)
Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara	Reduction of Protein Adsorption on Well-characterized Polymer Brush Layers with Varying Chemical Structures	Colloid Surf. B: Biointerface	(2010) 81 (350-357)
Toru Moro, Yoshio Takatori, Masayuki Kyomoto, Kazuhiko Ishihara, Saiga, Kouzo Nakamura, Hiroshi Kawaguchi	Surface Grafting of Biocompatible Phospholipid Polymer MPC Provides Wear Resistance of Tibial Polyethylene Insert in Artificial Knee Joints	Osteoarthritis Cartilage	(2010) 18 (1174-1182)
Sang Ho Ye, Carl A. Johnson Jr, Joshua R. Woolley, Hironobu Murata, Lara J. Gamble, Kazuhiko Ishihara, William R. Wagner	Simple Surface Modification of a Titanium Alloy with Silanated Zwitterionic Phosphorylcholine or Sulfobetaine Modifiers to Reduce Thrombogenicity	Colloid Surf. B: Biointerface	(2010) 79 (357-364)
Masayuki Kyomoto, Toru Moro, Yasuhiko Iwasaki, Fumiaki Miyaji, Hiroshi Kawaguchi, Yoshio Takatori, Kozo Nakamura, Kazuhiko Ishihara	Lubricity and Stability of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) Polymer Layer on Co-Cr-Mo Surface for Hemi-arthroplasty to Prevent Degeneration of Articular Cartilage	Biomaterials	(2010) 31 (658-668)
Kimiaki Takami, Junji Watanabe, Madoka Takai	Spontaneous Formation of a Hydrogel Composed of Water-soluble Phospholipid Polymer Grafted with Enantiomeric Oligo(lactic acid) Chains	J. Biomater. Sci. Polym. Edn.	22(1) 77-89 (2011)
Hyung Il Kim, Kazuhiko Ishihara, Seungbok Lee, Ji-Hun Seo, Hye Young Kim, Dongwhan Suh, Min Uk Kim, Tomohiro Konno, Madoka Takai, Jeong-Sun Seo	Tissue response to poly(L-lactic acid)-based blend with phospholipid polymer for biodegradable cardiovascular stents	Biomaterials	32(9) 2241-2247 (2011)

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷り

## Needle fibers of an azo-dye mixture induce polyploidy in a Chinese hamster cell line CHL

Atsuko Matsuoka<sup>#</sup>, Yoshie Matsuda, and Masa-aki Kaniwa

In a routine safety evaluation of chemicals included in household products, we found a mixture of azo dyes (CMBA, main component: *N*-[5-[(2-cyanoethyl)ethylamino]-4-methoxy-2-[(5-nitro-2,1-benzisothiazol-3-yl)azo]phenyl]acetamide) that precipitated in the culture medium in a characteristic fiber form (around 2 - 33  $\mu\text{m}$  in length) similar to that of asbestos. We compared CMBA with an asbestos, chrysotile B, in a cytotoxicity, chromosome aberration (CA), and micronucleus (MN) test in a Chinese hamster lung cell line (CHL). In the cytotoxicity test, the 50% growth inhibition concentration was 11.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for CMBA and 0.398  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for chrysotile B asbestos. CMBA and chrysotile B both induced polyploidy in the CA test and equal-sized binucleated and polynuclear cells in the MN test. CMBA differs from chrysotile B chemically. The former is an organic chemical and the latter is a mineral. Although CMBA is soluble in methanol and can be safely disposed by burning, it should be handled carefully when manufactured in a factory.

Keywords: aneugen, azo dye, chrysotile B, fibers

## 1. Introduction

In a routine safety evaluation, we examined a mixture of azo dyes (CMBA) that has been manufactured for textile dyeing. In the chromosome aberration test, CMBA precipitated in the culture medium as a fiber and the shape and size looked like those of asbestos. Concerned that CMBA might show the same activity as asbestos, we studied it further comparing with the activity of chrysotile B asbestos.

## 2. Materials and methods

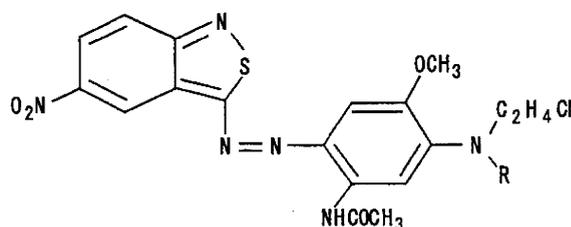
### 2 - 1. Chemicals

A mixture (CMBA) of *N*-[5-[(2-cyanoethyl)ethylamino]-4-methoxy-2-[(5-nitro-2,1-benzisothiazol-3-yl)azo]phenyl]acetamide (A: 96.98%; CAS No. 172463-55-7) and *N*-[5-[(2-cyanoethyl)amino]-4-methoxy-2-[(5-nitro-2,1-benzisothiazol-3-yl)azo]phenyl]acetamide (B: 1.26%) with 1.76% unknown chemicals was synthesized by the ordinary azo-coupling method. The chemical structures of two main components, A and B, are shown in Fig. 1. CMBA was dissolved in dimethyl

sulfoxide (DMSO). Chrysotile B (UICC) as a reference material was suspended in the culture medium.

### 2 - 2. Cells

CHL cells were established from the lung of a female newborn Chinese hamster by Koyama et al.<sup>1)</sup> and cloned by Ishidate and Odashima<sup>2)</sup>. They were maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM; GIBCO 11095-080) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (GIBCO 15140-122) in 5%  $\text{CO}_2$  in air at 37°C. The doubling time was around 13 h, and the modal chromosome number was 25.



A:  $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}=467.50$

B:  $\text{R}=\text{H}$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}=439.45$

Fig. 1 Chemical structures of A and B, the two main components of CMBA

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Atsuko Matsuoka; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9268; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: matsuoka@nihs.go.jp