

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
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名

プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究

主任研究者	新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
分担研究者	藪島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
協力研究者	田中 賢	山形大学大学院理工学研究科
	福井 千恵	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
	比留間 瞳	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

研究要旨

平成 25 年度の本研究では、平成 24 年度に選定した血液適合性評価マーカ候補蛋白質の絶対定量を行い、その有用性を検証した。

組成比の異なる 2-Methoxyethylacrylate (MEA) / Hydroxyethylmethacrylate (HEMA) ランダム共重合体、Polyvinylpyrrolidone (PVP) 含量の異なるポリスルホン (PSF) 及びその他の一般合成高分子やチタン材料等、生体適合性の異なる 23 種類の材料に吸着する血漿・血清蛋白質を対象として比較検討した結果、第Ⅶ因子 (FA7)、第Ⅸ因子 (FA9)、第一補体成分 C1s、フィブロネクチン (FINC) 及びビトロネクチン (VTNC) が血液適合性評価マーカとして利用できることが確認された。第Ⅻ因子 (FA12)、フィブロネクチン (FIBB)、第一補体成分 C1r 及びグルタチオンペルオキシダーゼ 3 (GPX3) も評価マーカとして利用可能であるが、生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若干存在した。一方、第三補体 (C3)、第五補体 (C5)、補助因子 H 関連蛋白質 1 (FHR1) 及び不活性型ホスホリパーゼ D5 (PLD5) は偽陰性を示す材料が存在するため、評価マーカとして不適であることが判明した。

今後、ステント用金属材料、血栓捕捉デバイス及び血液透析器用中空糸等への血漿蛋白質吸着挙動を解析し、関連データを更に蓄積することにより、材料/細胞界面特性から高分子材料の血液適合性を評価する新規 *in vitro* 試験法の有用性を詳細に検証する。また、MEA/HEMA 系材料表面に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量を分析における標準誤差が統計学的に 95%信頼区間に入るまで繰り返し測定し (n=10)、その平均値+10%RSD を血液適合性の適否を判定する閾値として提案する。

A. 研究目的

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。これは、医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その

界面 (バイオインターフェース) で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。細胞は材料表面上で構造変化した吸着蛋白質を介して材料に接着する

ことにより、最終的な生体反応を誘導する。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。

医用材料の蛋白質吸着については、血栓形成や細胞接着等に着眼した研究が行われてきたが、材料に吸着する蛋白質の種類を網羅的に解析し、その吸着パターンから材料の機能や生体適合性を評価する研究は現在までに実施されていない。材料表面への蛋白質吸着挙動から細胞や組織に対する影響を評価する手法は材料プロテオームと呼ぶべき新しい分野のプロテオミクスとなる。プロテオミクスの技術は培養細胞や埋植材料周辺域における組織の性状変化の解析等にも利用できる。網羅的解析により特定のバイオマーカーを決定することができれば、標的プロテオミクスを利用した同マーカーの微量定量が可能となり、材料の機能や生体適合性、細胞又は組織の状態等を判断するための有益な評価手法となり得る。

インプラント型の循環器系医療機器では、長期間に渡って血液凝固や血栓形成等を起こさないことが要求される。血液適合性の評価としては、血栓形成、血液凝固、血小板、溶血性及び補体系の5つの試験項目が存在するが、未だ国際的に十分整合されていない状況にある。そこで本研究では、バイオインターフェースの特性に着目した医用材料の新規評価方法を開発することを目的として、高分子材料表面への蛋白質吸着挙動と血液適合性の相関性について検討してきた。

平成24年度の本研究では、血液適合性に優れたMEA/HEMAランダム共重合体のほか、PVP含量の異なるPSFを試験材料とし

て選択し、各材料表面への蛋白質吸着挙動を解析し、過去に取得した対照合成高分子材料（ポリエチレンテレフタレート[C-PET]、三酢酸セルロース[CTA]、ポリスチレン[PS]、ポリテトラフルオロエチレン[PTFE]及び超高分子量ポリエチレン[UHMWPE]）の解析結果と比較検討することにより、1)内因系血液凝固活性化リガンドとしてVTNC及びFINC、2)補体及び補助因子としてC1r、C1s、C3、C5及びFHR1、3)血液凝固因子としてFA7、FA9、FA12及びFIBB、4)その他の蛋白質としてGPX3及びPLD5を血液適合性評価マーカー候補蛋白質として選定した。

平成25年度の本研究では、過去に実施したチタン材料も含めて、上記の各種材料表面に吸着するこれらのマーカー候補蛋白質の絶対定量を行い、血液適合性評価マーカーとしての有用性を検証した。

B. 研究方法

(1)MEA/HEMA表面の作製

メタノールで洗浄した菅原工芸製ポリカーボネート(PC)シート(φ33 mm、厚さ0.1 mm)をADVANTEC製PTFEメンブランフィルタ(φ47 mm、ポアサイズ0.5 μm)を介してKYOWARIKEN製スピンコータ(K-359SD-1 SPINNER)に固定し、4000 rpm回転下、PMEA、PHEMA及び組成比の異なるMEA/HEMAランダム共重合体(混合比75:25、50:50、25:75 w/w%)のメタノール溶液(1 w/v%、100 μL)をPCシートの中央に滴下し、10秒間保持した。乾燥後、同様の操作を再度繰り返すことにより、表面を均一にコーティングした。片面のコーティングが終了した後、もう片面を同様に処理して両面コートPCシートを作製した。

(2) 血漿蛋白質の吸着と回収

PMEA、PHEMA 及び MEA/HEMA ランダム共重合体をコーティングした PC シート (10 枚/試料) をそれぞれ個別に 15 φ cm ガラス製シャーレ中で 20 mL のヘパリン加ヒト血漿 (コージンバイオ) に 37°C で 1 時間緩やかに振とう/浸漬した後、同血漿を除去した。次いで、同材料を氷冷した 1 mM PBS により 5 回洗浄した後、20 ml の細胞溶解液 (尿素 7M、チオ尿素 2M、Tris 30 mM、CHAPS 4% : pH 8.5) を添加し、室温で 60 分間、緩やかに振とうした。同溶液を Corning 社製 Spin-X UF (Cut Off = 5 kDa) により濃縮し、冷メタノール沈殿法により蛋白質画分を回収し、細胞溶解液に再溶解した後、GE 社製 2DQuant により蛋白質量を測定した。得られた蛋白質は試験に供するまで凍結保存した。対照試料として、尿素変性ヒト血漿蛋白質を同様の方法により調製した。

(3) その他の蛋白質試料¹⁻³⁾

種々の化学処理を施したチタン材料 (Ti1-6)、対照合成高分子材料 (PSF、C-PET、CTA、PS、PTFE 及び UHMWPE) 及び PVP 含量の異なる PSF 材料 (PSF1-6) の吸着蛋白質は過去の研究において調製した保存試料を使用した。各材料の詳細情報 (表面処理法、処方、物理化学的性状及び蛋白質吸着量等) については、過去の報告書に掲載済みである。

(4) 定量用標準品の化学合成

13 種類の血液適合性評価用マーカ候補蛋白質を定量するため、各材料表面に吸着した蛋白質の網羅的解析において共通且つ高感度で検出されたペプチドを定量用プローブとして選択し、化学合成した

(表 1)。内部標準用ペプチドは安定同位体標識した任意のアミノ酸を 1 残基導入して調製した (表 1: 赤字部分)。

(5) ペプチド試料の調製

常法に従って還元 (TBP) 及びアルキル化 (ヨードアセトアミド) した蛋白質試料 (50 µg) を含む細胞溶解液 8 µl に 50 mM NH₄HCO₃ (87.2 µl)、プロメガ社製 ProteaseMax Surfactant (1%, 3 µl) 及び Trypsin Gold (1 µg/ml, 1.8 µl) を添加し、37°C で 4 時間インキュベーションした後、10% TFA 5.25 µl を加え、室温で 5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドはバリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 µl) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、0.2 µg/µl の濃度になるように 0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、1/10 容量の内部標準物質溶液を添加した後、LC-MS/MS 分析に供した。

(6) LC-MS/MS による定量分析

三連四重極型質量分析装置 TSQ Vantage (Thermo Scientific) を使用し、Selected reaction monitoring (SRM) モードにより定量分析を行った。試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 0.8 kV) により行った。キャピラリー温度、Q1 分解能、Q3 分解能、コリジョンガス圧及びサイクルタイムは、それぞれ 150°C、0.5 unit、0.7 unit、1.2 mTorr 及び 15 秒とした。定量用標準品を利用した SRM チャンネルの最適化はダイレクトインヒュージョンモードにより行った。

Nano-LC としては、HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を装備した ADVANCE NanoUPLC (AMR) を使用した。ト

ラップカートリッジ及び分析用逆相カラムとしては、それぞれ CERI 社製 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm)、CERI 社製 L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3 µm, 12 nm) を使用した。イオン源としては、バックグラウンド低減装置 (AMR 製 ABIRD) を装備した AMR 社製 Captive Spray イオン源を使用した。Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1% TFA) と B 溶媒 (アセトニトリル) を使用した。流速は 300 nL/min とし、サンプル注入 (1.0 µg) はオートサンプラーを使用して行った。一分析当たりの溶出時間は 150 分とし、サンプル注入後、0-40%B/125 min → 40-55%B/130 min → 100%B/135 min → 100%B/140 min → 0%B/150 min のグラジエント条件により溶出した。次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。

C. 研究結果

(1) SRM チャンネルの最適化

定量用標準品を利用して、ペプチド毎に定量用チャンネル、定性用チャンネル、内部標準用チャンネルを最適化し、トランジットイオン (プレカーサーイオン及びプロダクトイオン)、コリジョンエネルギー及び S-lens 電圧を設定した (表 2)。定量用及び内部標準用チャンネルとしては、最も感度良く検出されるプロダクトイオンを選択し、定性用チャンネルには、その他の特徴的な解列に由来する 4 種のプロダクトイオンを利用した。

(2) 検量線の作成

表 3 に示した濃度情報に基づいて標準品試料を調製し、LC-MS/MS モードで測定することにより、検量線を作成した。各ペプチドの分離状況は良好であった (図

1)。図 2 に示したとおり、FA12 定量・定性用チャンネルは問題なく稼働し、その他のペプチド用に設定した各チャンネルのイオン検出状況も全て良好であった。また、各検量線の相関係数は 0.9966 から 1.0000 であり、いずれのペプチドともに低濃度領域から高濃度領域まで良好な相関が得られた (図 3)。

(3) 定量結果

図 4 に示したとおり、FA12 定量・定性用チャンネルのイオン検出状況は良好であり、その他のペプチド用の SRM チャンネルにも問題は認められなかった。

23 種類の材料に吸着する蛋白質を試料として、13 種類の血液適合性評価マーカ候補蛋白質を定量解析した結果を表 4 に示した。生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っており、特に C1s と VTNC の吸着量は MEA/HEMA 系材料とその他の材料間で大きく異なることが確認された。MEA/HEMA 系材料表面への FA12 吸着量も、その他の材料を下回っていたが、Ti-5 が MEA/HEMA 系材料に近い数値を示した。FIBB、C1r 及び GPX3 吸着量についても同様の傾向が認められたが、MEA/HEMA 系材料に近似した吸着量を示す材料が幾つか存在した。C3、C5、FHR1 及び PLD5 吸着量については、MEA/HEMA 系材料を下回る材料が幾つか確認された。

D. 考察

本研究では、生体材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から予測する評価系の確立を目指し、23種類の材料表面に吸着する蛋白質を試料として、血液適合性評価

マーカ候補蛋白質の絶対定量を行い、評価マーカとしての有用性を検証した。

血液凝固⁴⁻¹²⁾は内因系血液凝固と外因系血液凝固に大別される。血液凝固系は補体系や血管拡張、血管透過性亢進及び発痛を制御するカリクレイン・キニン系とも密接に関連している。これらの生体反応のメカニズムのほか、異物との接触により惹起される血液凝固及びエコノミークラス症候群の発症機序、リン脂質と血液凝固の相関性、細胞膜表面への組織因子の出現とサイトカイン刺激の相関性等については、過去に提出した報告書に詳細に記述した^{2,3)}。これらの知見は医用材料の血液適合性を理解するための基本となることから、本報告書と合わせて参照して頂きたい。

血液適合性材料として、超親水性表面、ミクロ相分離表面、細胞膜類似表面及び生理活性分子固定化表面等が開発され、その有効性が報告されて来たが、近年、材料表面の水和状態が血液適合性（抗血栓性）の要因である蛋白質吸着能や細胞接着能に深く関与することが明らかになりつつある。材料表面における水分子は存在様式により、超低温でも凍結しない不凍水、 -50°C 付近で低温結晶を形成する中間水及び 0°C で凍結する自由水に大別される。不凍水と自由水は多くの材料に共通して存在する水分子であるが、血液適合性の高い材料は不凍水と自由水のほか、中間水を持つことが確認されている。細胞膜と類似したベタイン構造を持つポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (PMPC) は中間水を有する代表的な高分子材料の 1 つであり、蛋白質吸着能や細胞接着能が非常に低く、血栓が形成されない性質を持つことから、

血液適合性が要求される医療機器や医用材料の表面加工に利用されている¹³⁻¹⁶⁾。PVP 及び PMEA も中間水を有する代表的な高分子材料である。PMEA は、有機溶媒への易溶解性、非水溶性、透明性、粘着性を併せ持っていることから様々な基材へのコーティングが可能である¹⁷⁻²⁴⁾。また、PMEA 表面は、血漿蛋白質の吸着・変性が少なく、脱離速度も早い特徴を持つことが知られている。PHEMA も蛋白質吸着が比較的少ない生体適合性材料であり、コンタクトレンズをはじめとした各種の医療機器に利用されている。PHEMA は、PMEA と異なり -50°C 付近に中間水ピークが認められないが、核酸や多糖類等の生体成分と同様、低温凝固水を有する高分子材料である。一方、本研究において使用したその他の材料は MEA/HEMA 系材料と比較して血液適合性に劣る材料である。

生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料とその他の対照材料に吸着する蛋白質量を標的プロテオミクス解析により比較検討し、平成 24 年度までに選定した 13 種類の血液適合性評価マーカ候補蛋白質の有用性を検証した結果、MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っており、特に C1s と VTNC の吸着量は MEA/HEMA 系材料とその他の材料間で大きく異なることが確認されたことから、これらの 5 種類の蛋白質は血液適合性評価マーカとして利用できることが明らかとなった。MEA/HEMA 系材料表面への FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 吸着量も、その他の材料を下回っていたが、MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若干存在した。一方、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は偽陰性を示す材料が存在するため、評

価マーカとして不適であることが判明した。

今後、ステント用金属材料、血栓捕捉デバイス及び血液透析器用中空糸等への血漿蛋白質吸着挙動を解析し、関連データを更に蓄積するにより、材料／細胞界面特性から高分子材料の血液適合性を評価する新規 *in vitro* 試験法の有用性を詳細に検証する。また、MEA/HEMA 系材料表面に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量を分析における標準誤差が統計学的に 95%信頼区間に入るまで繰り返し測定し (n=10)、その平均値+10%RSD を血液適合性の適否を判定する閾値として提案する。

E. 結論

生体適合性の異なる 23 種類の材料に吸着する血漿・血清蛋白質を対象として比較検討した結果、FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC が血液適合性評価マーカとして利用できることが確認された。FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 も評価マーカとして利用可能であるが、生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若干存在した。一方、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は偽陰性を示す材料が存在するため、評価マーカとして不適であることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表等

1) Haishima Y, Hasegawa C, Nonura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, and Niimi S. Development and

performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, in press (2014).

2) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, and Niimi S. Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, in press (2014).

3) Haishima Y, Isama K, Hasegawa C, Yuba T and Matsuoka A. A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 101:2630-2643 (2013).

4) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y and Matsuoka A. Calcium-incorporated titanium surface influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 101:2573-2585 (2013).

5) Hoshino T, Narukawa Y, Haishima Y, Goda Y and Kiuchi F. Two new sulfated oleanan saponins from *Achyranthes* root. *J. Nat. Med.*, 67:386-389 (2013).

6) 中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子. ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含ま

- れるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131:50-57 (2013).
- 7) 齧島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園 知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上 薫, 森川朋美, 市村亮平, 前田 潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 浜田信城, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: ラット精巢に及ぼす DOTP の影響評価. 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月・熊本).
- 8) 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野健, 野村祐介, 新見伸吾. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価. 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月・京都).
- 9) Uematsu M, Haishima Y, Nakaoka R, Niimi S, Segawa K, and Nakano T. A novel evaluation methodology of materials for medical devices based on molecular dynamics simulation. The 15th International Conference on Biomedical Engineering (Jan., 2013 in Singapore).
- 10) 齧島由二, 福井千恵, 長部真博, 上野良之, 菅谷博之, 棚橋一裕, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾. ポリスルホン材料表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: PVP 含量と血液適合性の相関性について. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀).
- 11) 齧島由二, 福井千恵, 田中 賢, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾. HEMA/MEA ランダム共重合体表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: 血液適合性評価マーカの選定について. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀).
- 12) 野村祐介, 河上強志, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 犬飼香織, 竹ノ内美香, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 新見伸吾, 齧島由二. 溶血性試験用陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シートの性能評価. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀).
- 13) 加藤玲子, 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀).
- 14) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 瀬川勝智, 中野達也. 血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀).
- 15) 中岡竜介, 比留間 瞳, 齧島由二, 新見伸吾. SAM を利用したベタイン構造模倣表面調製とその構造に関する研究. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀).
- 16) 中村里香, 齧島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 安達玲子, 手島玲子. 加水分解小麦(グルパール 19S)に特異的に発現するペプチドの探索及び同定. 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013 年 11 月・富山).
- 17) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析 (第 2 報). 第 42 回医用高分子シン

ポジウム (2013年7月・青海).

- 18) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, and Matsuoka A. The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (Jun., 2013 in Boston).
- 19) 特願 2013-104082 (平成 25 年 5 月 16 日)「血液バッグ」. 発明者: 齧島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 柚場俊康.

参照資料

- 1) 齧島由二. プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究. 平成 22 年度厚生科学研究費補助金 (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 (H22-医薬一般-009)」分担研究報告書.
- 2) 齧島由二. プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究. 平成 23 年度厚生科学研究費補助金 (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 (H22-医薬一般-009)」分担研究報告書.
- 3) 齧島由二. プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究. 平成 24 年度厚生科学研究費補助金 (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. 「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」(H24-医薬-指定-018)」分担研究報告書.
- 4) 山本一彦, 他. カラー図解: 靭帯の正常構造と機能, IV. 血液・免疫・内分泌, 日本医事新報社, 2002 年.
- 5) 森 亘, 桶田理喜. 基礎病理学 第 7 版(監訳: ロビンス), 廣川書店, 2004 年.
- 6) 藤巻道男. 出血傾向のスクリーニング検査, 日本医師会雑誌, 109(2): 220-224 (1993).
- 7) 鈴木宏治. 血液凝固と血小板, 日本医事新報, 4313: 87-88 (2006).
- 8) 吉岡章, 杉本充彦. アンチトロンビン(AT)、プロテインC(PC)、プロテインS(PS): 最新臨床検査のABC, 日本医師会雑誌, 135(2): S89-90 (2006).
- 9) 鈴木宏治. プロテインC、プロテインS、APC レジスタンス、トロンボモジュリン: 臨床検査ガイド 1999-2000, 696-702 頁、文光堂, 1999 年.
- 10) 藤田稠清. 血小板凝集能亢進症: 重要で新しい血管の危険因子, 日本医事新報 4238: 26-32 (2005).
- 11) 高志昌宏, 大滝隆行, 小又理恵子. 5. 冠動脈血栓, Nikkei Medical, 2000 年 1 月号: 75 頁.
- 12) 川合陽子. 偽血小板減少症を確認するための再採血, 日本医事新報, 4299: 90-91 (2006).
- 13) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi. J. Biomed. Mater. Res., 39: 323 (1998).
- 14) K. Ishihara, E. Ishikawa, T. Mihara, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi. J. Biomater. Scie. Polym. Ed., 10: 1047 (1999).
- 15) H. Kitano, M. Imai, T. Mori, M. Gemmei-Ide, Y. Yokoyama and K. Ishihara. Langmuir, 19: 10266 (2003).
- 16) T. Hatakeyama, M. Tanaka and H. Hatakeyama. Acta. Biomaterialia., 3: 6091 (2009).
- 17) M. Tanaka, T. Motomura, M. Kawada, T. Anzai, Y. Kasori, T. Shiroya, K. Shimura, M. Onishi and A. Mochizuki. Biomaterials, 21: 1471 (2000).
- 18) M. Tanaka, T. Motomura, N. Ishii, K. Shimura, M. Onishi, A. Mochizuki and T. Hatakeyama. Polym. Int., 49: 1709 (2000).

- 19) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Motomura, K. Shimura, M. Ohnishi and Y. Okahata. Colloids. Surf., A, 193 : 145 (2001).
- 20) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Shiroya, T. Motomura, K. Shimura, M. Ohnishi and Y. Okahata. Colloids. Surf., A, 203 : 195 (2002).
- 21) T. Ansai, A. Okumura, M. Kawamura, K. Yokoyama, H. Oshiyama, T. Kido and C. Nojiri. Jpn. J. Artif. Organs., 9 : 73(2000).
- 22) N. Saito, S. Motoyama and J. Sawamoto. Jpn. J. Artif. Organs., 24 : 547 (2000).
- 23) M. Tanaka and A. Mochizuki, J. Biomed. Mater. Res., A, 68 : 684 (2004).
- 24) M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura and T. Hatakeyama. Biomacromolecules, 3 : 36 (2002).

表1. 血液適合性評価マーカ定量用プローブ

Protein code	Protein name	Start/End	Sequence of unique peptide in PD	Isotope label	Modification	Charge	Calculated [M+H] ⁺ (Cold)	Theoretical MW of hot peptide
VTNC	Vitronectin	198-212	DVWGIEGPIDAA F TR	13Phe: 13C9, 15N	None	2	1646.81694	1655.83633
C1r	Complement C1r subcomponent	668-682	WVATGIVSWGIG G SR	12Gly: 13C2, 15N	C13 (Carbamidomethyl)	2	1648.82536	1650.82130
C1s	Complement C1s subcomponent	524-534	TNFDNDIALV R	10Val: 13C5, 15N	None	2	1277.64751	1282.65350
C3	Complement C3	531-544	LVAYYTLIGAS G QR	12Gly: 13C2, 15N	None	2	1511.82036	1513.81630
C5	Complement C5	79-90	FGNSALTIQ P K	11Pro: 13C5, 15N	None	2	1359.76225	1364.76824
FA12	Coagulation factor XII	373-381	VVGG L VALR	8Leu: 13C6, 15N	None	2	883.57256	889.58190
FA7	Coagulation factor VII	338-350	FSLVSGW G LLDR	11Leu: 13C6, 15N	None	2	1477.77715	1483.78649
FA9	Coagulation factor IX	365-373	SALV L QYLR	8Leu: 13C6, 15N	None	2	1062.6314	1068.64074
FIBB	Fibrinogen beta chain	335-348	MGPT L LIEDW K	14Lys: 13C6, 15N2	None	2	1691.80449	1698.81087
FHR1	Complement factor H-related protein 1	271-281	EIMEN Y NIALR	10Leu: 13C6, 15N	None	2	1365.68242	1371.69176
GPX3	Glutathione peroxidase 3	186-197	FLV G PDGIP M R	10Ile: 13C6, 15N	None	2	1314.72356	1320.73290
FINC	Fibronectin	959-976	N T FAE V TGLSPG V TY F K	17Phe: 13C9, 15N	None	2	1993.98821	2003.00760
PLD5	Inactive phospholipase D5	380-386	LLLS F W K	5Phe: 13C9, 15N	None	2	906.54106	915.56045

表2. SRMチャンネル条件

Protein	Ion type	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	S-Lens (V)
FA12	Quan ion	442.500	685.0	15	106
	Qual 1	442.501	458.0	14	106
	Qual 2	442.502	426.0	11	109
	Qual 3	442.503	359.0	14	109
	Qual 4	442.504	199.1	14	109
IS	446.000	692.0	16	110	
PLD5	Quan ion	453.900	680.0	13	110
	Qual 1	453.901	567.0	15	115
	Qual 2	453.902	340.2	12	115
	Qual 3	453.903	333.2	22	104
	Qual 4	453.904	227.1	14	107
IS	459.000	690.0	13	108	
FA9	Quan ion	532.100	692.2	19	127
	Qual 1	532.101	791.2	17	127
	Qual 2	532.102	579.3	17	127
	Qual 3	532.103	451.3	25	127
	Qual 4	532.104	371.2	15	127
IS	535.600	699.2	18	127	
C1s	Quan ion	639.600	1062.0	21	160
	Qual 1	639.601	915.2	24	160
	Qual 2	639.602	571.2	27	160
	Qual 3	639.603	458.3	22	162
	Qual 4	639.604	216.1	22	162
IS	642.600	1068.0	23	162	
GPX3	Quan ion	658.100	955.0	21	152
	Qual 1	658.101	1054.0	24	152
	Qual 2	658.102	898.0	21	152
	Qual 3	658.103	527.8	15	152
	Qual 4	658.104	516.3	19	152
IS	661.600	962.0	22	153	
C5	Quan ion	680.700	1064.0	20	197
	Qual 1	680.701	812.0	19	192
	Qual 2	680.702	970.0	21	192
	Qual 3	680.703	586.0	21	196
	Qual 4	680.704	372.1	18	196
IS	683.700	1090.0	23	165	
FHR1	Quan ion	683.650	863.0	25	157
	Qual 1	683.651	1123.0	27	157
	Qual 2	683.652	992.0	21	157
	Qual 3	683.653	586.0	22	157
	Qual 4	683.654	359.2	22	157
IS	687.150	870.0	25	146	
FA7	Quan ion	739.700	1031.0	24	168
	Qual 1	739.701	1130.1	26	168
	Qual 2	739.702	944.2	22	179
	Qual 3	739.703	701.0	26	179
	Qual 4	739.704	348.1	26	179
IS	743.200	1038.0	26	179	
C3	Quan ion	756.700	575.0	23	189
	Qual 1	756.701	1065.0	23	193
	Qual 2	756.702	902.0	28	193
	Qual 3	756.703	447.2	21	193
	Qual 4	756.704	360.2	20	193
IS	758.200	578.0	23	193	
VTNC	Quan ion	824.200	946.8	28	193
	Qual 1	824.201	1245.8	26	193
	Qual 2	824.202	1075.8	25	193
	Qual 3	824.203	890.0	30	193
	Qual 4	824.204	458.2	32	202
IS	829.200	956.8	24	202	
C1r	Quan ion	825.250	922.0	28	214
	Qual 1	825.251	1363.0	29	215
	Qual 2	825.252	1021.0	25	215
	Qual 3	825.253	649.0	26	232
	Qual 4	825.254	479.0	26	243
IS	826.750	925.0	26	236	
FIBB	Quan ion	846.700	837.0	28	222
	Qual 1	846.701	1176.0	29	208
	Qual 2	846.702	1063.0	29	197
	Qual 3	846.703	950.0	31	216
	Qual 4	846.704	448.1	20	232
IS	850.700	845.0	28	224	
FINC	Quan ion	997.900	974.0	30	220
	Qual 1	997.901	1332.0	37	229
	Qual 2	997.902	1231.0	30	250
	Qual 3	997.903	1061.0	33	265
	Qual 4	997.904	721.0	25	251
IS	1002.900	984.0	27	227	

Capillary temperature = 150°C
 Spray voltage = 800V (positive mode)
 Q1 resolution = 0.5 unit Q3 resolution = 0.7 unit
 Collision gas pressure = 1.2 mTorr
 Cycle time = 15 sec

表3. 検量線情報

ペプチド	初濃度 (ng/mL)	希釈系列 (倍)	ポイント数	内標濃度 (ng/mL)	内標 添加量	内標最終 濃度 (ng/mL)
C1r	48.26	10	5	504.0	1/10	45.82
C1s	20.37	10	5	196.0	1/10	17.82
C3	21.36	10	5	195.0	1/10	17.73
C5	19.29	10	5	185.0	1/10	16.82
FA12	20.27	10	5	174.0	1/10	15.82
FA7	20.67	10	5	228.0	1/10	20.73
FA9	22.45	10	5	188.0	1/10	17.09
FHR1	25.52	10	5	200.0	1/10	18.18
FIBB	505.50	2	5	4080.0	1/10	370.91
FINC	19.19	10	5	235.0	1/10	21.36
GPX3	20.97	10	5	202.0	1/10	18.36
PLD5	22.95	10	5	175.0	1/10	15.91
VTNC	40.55	10	5	392.0	1/10	35.64

表4. 血液適合性評価マーカ候補蛋白質の定量結果

(amol/cm²)

Material	FA7	FA9	FA12	FIBB	C1r	C1s	C3	C5	FHR1	FINC	VTNC	GPX3	PLD5
PMEA	11.90	6.60	5.36	12843.12	NF	NF	4.33	0.57	0.85	0.17	7.29	19.44	5.80
MEA/HEMA (75:25)	3.16	0.41	1.36	3591.91	NF	0.08	33.25	0.18	17.61	NF	1.48	5.49	0.64
MEA/HEMA (50:50)	2.57	0.75	1.68		IS	80.77	65.60	0.01	11.50	0.70	9.82	7.20	1.30
MEA/HEMA (25:75)	1.05	4.78	4.20		IS	111.45	56.65	17.36	8.84	0.54	2.71	19.27	3.99
PHEMA	4.59	4.35	3.84	12362.8	350.6	0.16	128.9	0.60	20.8	4.07	4.87	8.23	2.62
PSF	4122.04	3829.16	19102.48	4221556.85	177118.33	10041.50	19243.29	1964.99	19504.79	12058.44	718869.40	37745.40	448.55
C-PET	42.45	232.98	18.26	32779.25	1005.80	30.20	367.35	8.66	82.10	867.47	11371.42	94.16	11.43
CTA	551.12	434.69	1448.04	1774936.11	25833.70	6005.76	133029.16	2005.23	1771.10	232.25	74337.25	4715.26	61.54
PS	41.43	80.20	18.89	42207.51	418.66	80.46	248.47	4.04	40.60	2336.86	4655.15	24.54	0.32
PTFE	192.33	140.83	15.22	22230.86	219.73	13.16	453.46	85.83	30.18	49.30	1572.24	436.99	3.98
UHMPE	112.17	330.06	39.99	48155.44	549.15	70.00	188.92	22.29	56.41	2373.24	5118.91	82.17	6.32
PSF_1	IS	2077.45	309.02	IS	19671.42	IS	877.38	NF	IS	522.63	IS	65259.36	344.81
PSF_2	IS	6741.42	748.94	IS	IS	IS	4977.57	39.59	IS	1157.20	IS	54770.34	139.90
PSF_3	5835.01	5891.12	3824.64	IS	78351.16	1508.06	38855.04	1893.84	27356.01	10664.57	IS	37757.64	1116.57
PSF_4	29103.76	23933.32	3509.71	IS	143256.34	10633.09	33869.70	4320.79	93018.88	2936.58	IS	104636.80	1342.11
PSF_5	20768.11	5157.45	3615.09	IS	29077.61	1601.59	18263.11	1174.40	26301.27	5225.16	IS	67364.27	76.62
PSF_6	583.70	38.92	21.82	IS	IS	14.34	6.20	NF	28.22	IS	IS	1196.45	13.59
TI_1	566.14	88.97	10.71	22106.04	6039.00	395.38	69.31	0.47	17.79	IS	11945.17	40.30	3.46
TI_2	5606.44	8874.74	24823.42	243920.15	17299.64	1654.33	5043.29	1928.01	47001.67	4049.16	IS	3360.55	38.62
TI_3	674.81	289.88	36.46	40848.45	7203.56	851.15	46.53	11.75	37.18	136.09	40162.10	332.05	11.26
TI_4	38816.92	15314.59	7562.53	310027.34	27322.37	3958.57	3120.50	2916.46	5048.42	3030.16	IS	2348.00	15.59
TI_5	266.60	56.86	6.74	14057.15	1350.50	91.49	5.79	1.07	7.70	21.95	4577.16	31.55	3.01
TI_6	398.92	97.98	28.06	IS	5245.59	165.50	12.46	8.28	88.48	IS	9594.58	32.26	7.71

NF, not found. IS, ion suppression

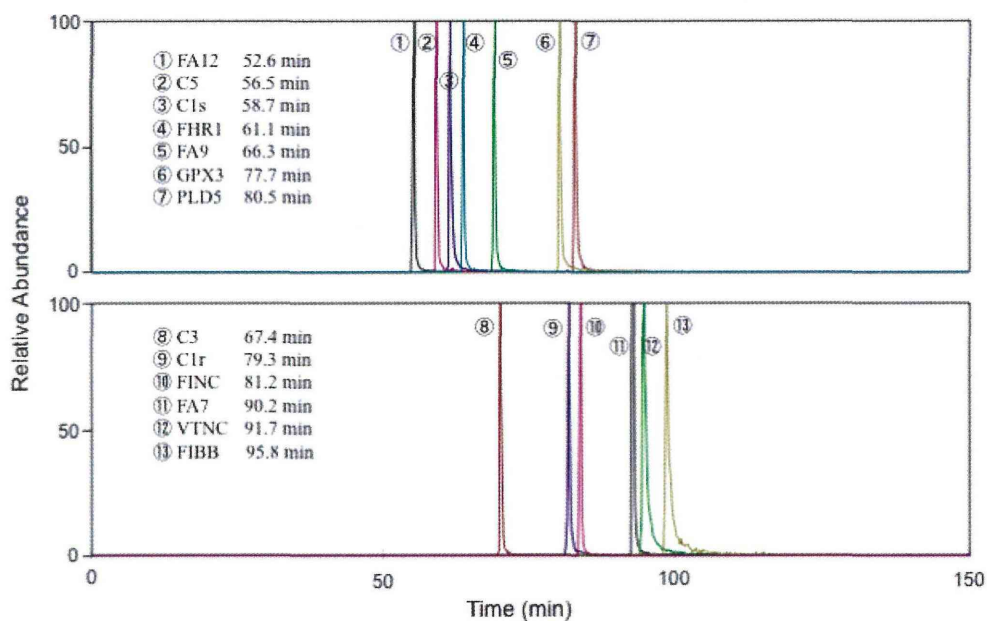


図1. LC-MS/MS分析における標準品の保持時間とピーク分離状況

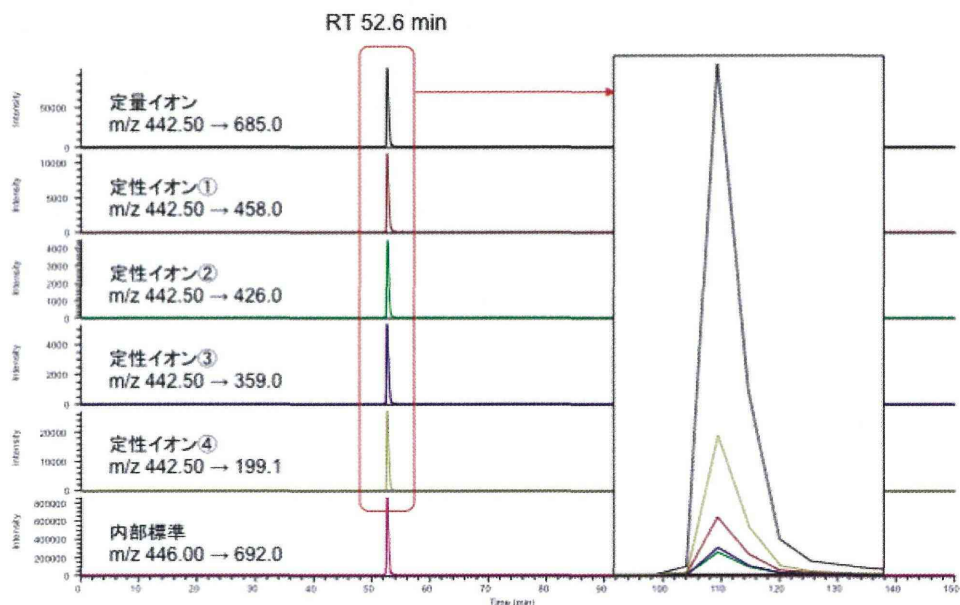


図2. FA12定性・定量用チャンネルのイオン検出状況(標準品)

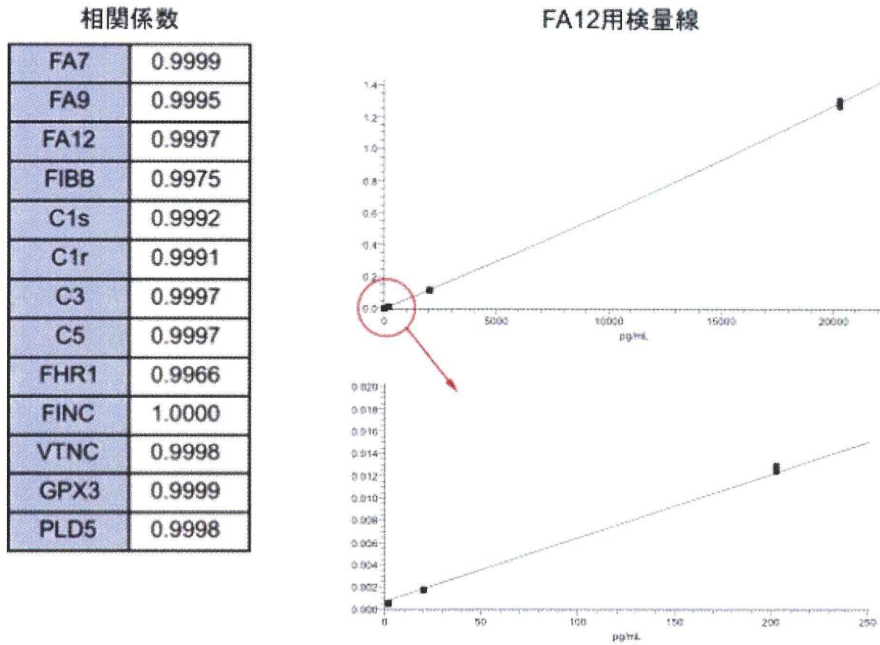


図3. 検量線の相関係数とFA12用検量線

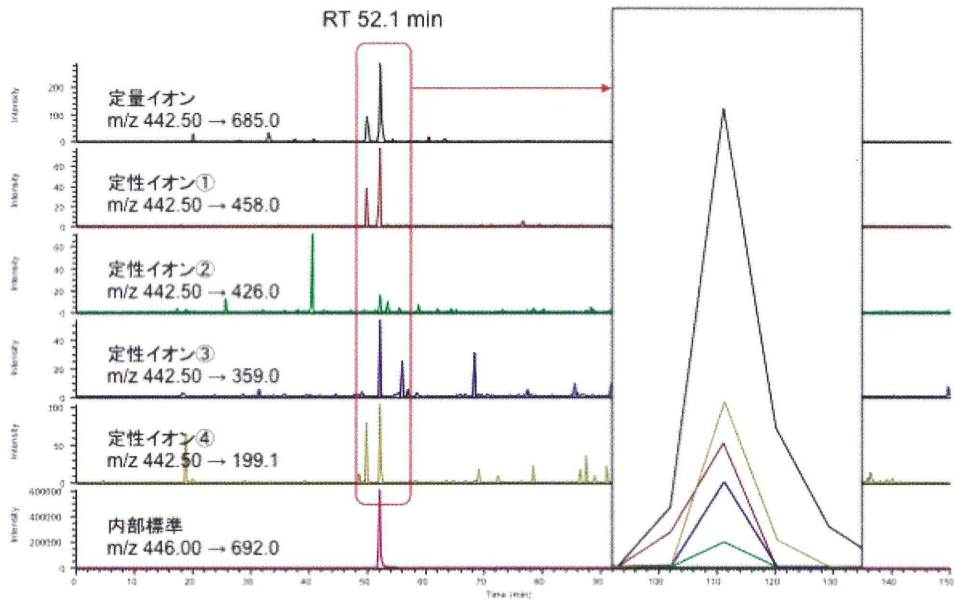


図4. FA12定性・定量用チャンネルのイオン検出状況(実試料:Ti-2)

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
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
医用材料の血液適合性を含む生体適合性における細胞応答に関する研究

研究分担者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
研究協力者 小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
比留間 瞳 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
田中 賢 山形大学大学院理工学研究科

研究要旨

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については、血液適合性試験が要求される。現在、本邦においては、平成 24 年 3 月に発出された通知をもとに試験が実施されている。この通知において、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の 5 つの試験項目が挙げられている。評価項目の中から製品の用途、血液との接触期間等に応じて選択、実施されるが、試験の実施方法についての詳細な記載があるのは溶血性試験についてのみであり、ヒトの血液を用いて実施する試験法については、試験系の適切性、検出感度などについての検証が十分に行われていない。

本年度の研究においては、各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、まず試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、次に高分子材料に対して、実際に血液適合性試験を実施した。混合比の異なる 2-methoxyethyl acrylate (MEA) / 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) シート及び 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) シートを用いて、予備試験及び本試験を行った結果、TAT 及び β -TG では、大まかな傾向が似ていた。C3a、C5a、SC5b-9 では、両試験で結果がほぼ一致していた。C3a では、2 時間のインキュベーションによりシートなしでも値が上昇し、被験試料による差はほとんど観察されなかった。C5a、SC5b-9 では、特定のシートにおいて上昇が観察された。MEA/HEMA の混合比を変えたシート間では、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9 で HEMA の比率が増えるに従って値が増加する傾向が観察された。今後、引き続き MEA、HEMA、MPC 等の高分子材料に対して、血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について検証を進め、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

一方、混合比の異なる MEA/HEMA シートについて、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、抽出法により V79 細胞に対する細胞毒性試験を実施した。その結果、いずれの混合比の MEA/HEMA シートにおいても細胞毒性は認められなかった。

A. 研究目的

医用材料の生体適合性は、材料表面の物理学的特性により大きく影響される。循環器系医療機器の基本的かつ最も重要な特性として、血液との接触があげられる。特に埋植する機器では、長期間にわたって血液凝固、血栓形成を起こさないことが要求される。医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については、血液適合性試験が要求される。本邦においては、図1に示すように、平成15年2月に発出された「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」（厚生労働省 薬食機発 0213001号 通知）、平成15年3月に発出された「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」（医療機器審査 No.36 事務連絡）に基づいて、長年、生物学的安全性試験が実施されてきた。この事務連絡中で、血液適合性試験においてはISO 10993-4(1992)、ISO/DIS 10993-4(2000)、ASTM F756-93が引用規格にされており、評価概要、溶血性試験、試料の調製法について言及されていた。これらの通知及び事務連絡に対して見直しが進められ、平成24年3月に「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（薬食機発 0301 第20号 通知）が発出され、現在はこの通知を元に、生物学的安全性試験が行われている。血液適合性試験に関しては、2002年に発行されたISO 10993-4 (Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4, Selection of Test for Interactions with Blood) 本体及び2006年に発行された Amendment が、国際的な規格となっているが、2009年より改訂作業が進められている。本邦において平成24年発出された第20号通知では、このISO 10993-4(2002) /Amd.1(2006)及びASTM

F756-08が、引用規格となっている。これらの通知、規格において、試験について詳細な方法が規定されているのは、赤血球に対する影響を評価する試験法である溶血性試験についてだけであり、その他の評価項目については、詳細は規定されていない。溶血性試験についても、米国で規格化されたNIH法、ASTM法及び日本のMHLW法の3種の試験法が存在し、試験法により判定に差が生じる例もあり、国際的にみても整備されていない状況にある。溶血性試験については、ISO 10993-4の改訂作業の一部として、ISO/TC194 WG9が主体となって、溶血性試験のラウンドロビン試験が進められている。

平成24年 厚労省発出の第20号通知「第8部 血液適合性試験」においては、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の5つの試験項目が挙げられており、それぞれの試験項目について標準的な評価項目が挙げられている（図2）。血栓形成では、付着物／付着状態の観察が標準的な評価項目とされている。血栓形成は血液凝固システムと血小板の活性化が関与していると考えられており、体内循環血液に接触する場合は *in vivo*、体外で血液に接触する場合は *in vitro* もしくは *ex vivo* の評価の実施が考慮される必要がある。血液凝固においては、トロンビン-抗トロンビン複合体 (TAT)、フィブリノペプチド A (FPA)、部分トロンボプラスチン時間 (PTT) が標準的な評価項目として挙げられている。図3に血液凝固系カスケードと評価項目について示したが、血液凝固系カスケードには内因系と外因系に大別され、TAT、FPAは内因系、PTTは外因系の因子である。PTTは動物血を用いて評価することが可能であるが、TAT、FPAの測定は、免疫検定法 (ELISA) が推奨されるため、

ヒトの血液による試験系の設定が必要になる。血小板においては、血小板数、血小板放出因子 (β -トロンボグロブリン (β -TG))、血小板第4因子 (PF4) が標準的な評価項目として挙げられている。血小板の活性化の評価は、血栓形成の指標として重要である。血小板は試験試料表面に接着し、偽足を伸長させて粘着し、凝集反応を行う。血小板には、 α 顆粒、濃染顆粒、リソソームが存在し、活性化に伴ってケモカイン、増殖因子、細胞外基質、粘着タンパク質、凝固制御因子、線溶阻害物質、セロトニン、ADP、ATP 等が放出される。 β -TG、PF4 は共に、 α 顆粒より放出される血小板顆粒物質である。 β -TG、PF4 の測定も ELISA が推奨されるため、使用できる動物種が限定される。血液学的項目においては、全血算 (CBC)、溶血が評価項目として挙げられている。CBC では試験試料曝露後の赤血球数、白血球数、血小板、ヘモグロビン量を測定する。溶血に影響する因子として、化学的因子と物理的因子があり、血液循環に関与する医療機器では物理的影響について考慮する必要があるが、物理的影響を無視できる医療機器に関しては、既に確立されている *in vitro* の試験法を用いて評価することができる。補体系では、補体活性化産物 (C3a、C5a、SC5b-9) が標準的な評価項目として挙げられている。補体活性化の径路には、古典径路、副径路、レクチン径路が知られている。古典径路では、C1、C4、C2、C3 の順に活性化が起こる。レクチン径路では、マンノース結合レクチン (MBL)、MBL 関連セリンタンパク分解酵素 (MASP) が活性化に関与する。図4に副径路を示したが、副径路では C3 から直接活性化が始まる。以下の活性化の径路は3経路共通で、C3 転換酵素により C3 から C3a、C3b を生じ、次に C5 から C5a、C5b が生じ、C5b と C6789 から C5b6789

(C5b-9) 膜侵襲複合体 (MAC) が形成され、SC5b-9 を生じる。評価項目として挙げられている C3a、C5a、SC5b-9 は、3 経路共通の活性化径路部分において、それぞれ C3a が初期、C5a が中期、SC5b-9 が後期の可溶性活性化産物である。血液適合性試験の標準的な評価項目として挙げられているこれらの項目の中から、製品の用途、血液との接触期間等に応じて選択、実施されている。特に、ヒトの血液を用いて実施する試験法については、試験系の適切性、検出感度などについての検証が十分に行われていない。

本研究では、「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」の一環として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の各試験法の国際整合に必要な基礎データの収集を行い、試験の妥当性についての総合的な検証を行うことを目的とする。評価においては、本研究班において、医用材料/細胞界面特性に着目した、生体反応、細胞機能等への影響におけるマーカー検索、分子動力的シミュレーショングループの研究成果と合わせ、新たな評価手法の開発を目指す。本研究の成果は、新規医療機器の開発及び承認審査の迅速化に寄与するほか、ISO や JIS 規格にフィードバックできる等、厚生行政的にも重要であると思われる。

本年度の研究においては、まず、各試験法の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うための、試験法についての調査、試験実施方法の確認 (キットの選定) 作業を行い、次に、2-methoxyethyl acrylate (MEA)、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) をコートしたシートを用いて、実際に血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について検証を行い、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基

礎的データを収集した。

B. 研究方法

1. 材料

Polycarbonate (PC) シート (34mm φ、厚さ 0.1mm、菅原工芸) に、MEA : HEMA = 0% : 100% (PHEMA)、25% : 75% (M25H75)、50% : 50% (M50H50)、75% : 25% (M75H25)、100% : 0% (PMEA) の 5 段階の混合比のポリマー溶液及び MPC ポリマー (Lipidure、日油) 溶液をコートした。コート方法は、1 wt % (MeOH) 溶液を、滴下量 100 μL でスピコート (4000 rpm, 10 sec, 表裏各 2 回コート) した。対照シートとして、PC シート (未コート) 及び Polyethylene terephthalate (PET) シート (未コート) を用いた。MEA/HEMA 液は、共同研究者の田中先生より供与いただいた。

2. 血液適合性試験

1) 採血

翼付針 (テルモ、予備試験 : 23G、本試験 : 21G) を用い、組織因子を含む血液を除くため、まず 5 mL 注射筒 (テルモ) で採血後、50 mL または 30 mL 注射筒 (テルモ、予めヘパリン (田辺三菱製薬) final 2 U / mL 含有) で必要量の血液を採取した。

2) インキュベーション

3 もしくは 4 分割した被験シート 2 枚を重ねないように 15 mL polypropylene (PP) チューブに入れ、6 mL の全血 (6 cm² / 1 mL 全血) と 37°C、2 時間、緩やかに振盪 (60 rpm) した。予備試験では、PET、PC (未コート)、PHEMA、PMEA、MPC シートについて実施し、本試験では、PET、PC (未コート)、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEA、MPC シートについて実施した。予備試験ではチューブを斜めに立てて振盪し、本試験では、チュ

ーブを横にして振盪し、15 分毎にチューブ回し、上下が入れ替わるようにした。

3) サンプリング

インキュベーション開始時及びインキュベーション終了後、各試験項目に応じて血液をサンプリングした (図 3)。血液凝固因子測定用はクエン酸含有チューブ (テルモ)、血小板因子測定用は CTAD (citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole、血小板刺激抑制) 含有チューブ (BD)、補体系測定用には、Futhan (Nafamostat Mesilate (補体分解阻害剤)、鳥居薬品、final 5 μg/mL) 添加 EDTA-2K 含有チューブ (テルモ) にサンプリングし、図 3 に示す氷中静置、遠心等の処理を行った後、分注して -30°C で保存した。溶血性試験は、全血をそのままサンプリングして用いた。

4) 溶血性試験

各時間にサンプリングした全血を、PBS 又は蒸留水と血液を 7:1 で穏やかに転倒混和した。750 x g で 5 分間、冷却遠心し、上清を分取した。PBS で 10 倍希釈し、576 及び 540nm の吸光度を測定した。ASTM 法ではクエン酸処理血、NIH 法ではシウウ酸処理血、MHLW 法では脱繊維血を試験に用い、先に血液を希釈後、接触試験を行い、吸光度を測定することから、参考データとした。溶血率 (%) は、(試験液上清の吸光度 - ブランク) / (完全溶血上清の吸光度 - ブランク) x 100 で算出した。

5) 血液凝固系の測定

TAT の測定は、凍結保存したクエン酸処理血を ELISA (エンザイグノスト TAT micro、SIEMENS) により測定した。

6) 血小板活性化の測定

β-TG の測定は、凍結保存した CTAD 処理血を ELISA (アセラクロム β-TG TMB、Roche) により測定した。

7) 補体系の測定

C3a、C5a、SC5b-9 の測定は、凍結保存

したフサン/EDTA-2K 処理血を、ELISA により測定した。測定キットは、C3a

(MicroVue C3a plus EIA Kit、QUIDEL)、C5a (MicroVue C5a EIA Kit、QUIDEL)、SC5b-9 (MicroVue SC5b-9 plus EIA Kit、QUIDEL) を用いた。

5)~7)の ELISA による測定は、キットの添付文書に従って実施した。推奨の希釈により検量線上に値が乗らない場合は、希釈倍率を変更し再検討を行い、全サンプルを同じ希釈倍率で測定した。

3. V79 細胞を用いた細胞毒性試験

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い細胞毒性試験を実施した。

1) 細胞株および培養方法

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞V79は、JCRB細胞バンク(吹田)より入手した。V79細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化FBS)、Penicillin-streptomycinを含むMinimum Essential Medium (MEM) (GIBCO)にて、37°C、5% CO₂-95% airインキュベーターで培養した。細胞株は、3-4日ごとに継代した。細胞毒性試験に際しては、培地に Amphotericin Bを添加して実施した。

2) 抽出方法

UV滅菌 (5 min x 2) した被験シート (PC (未コート)、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEA) 各4枚を、3もしくは4分割し、乾熱滅菌したガラス容器に入れた。6 cm² / 10 mLとなるように培地を入れ、乾熱滅菌したシリコンシートを挟んでスクリーキャップで蓋をした。37°C、5% CO₂-95% air インキュベーターに24時間静置した。ガラス容器から取り出した抽出液を、100%試験液とし、培地にて2倍希釈系列を作成し、細胞毒性試験に用いた。

抽出液の色から、培地のpHが中性域であることを確認した。

2) 細胞毒性試験・コロニー法

V79 細胞を 50 cells / 0.5 mL で 24-well プレートに播種した。翌日、培地を除き被験液を添加し、さらに4日間静置培養した。その後、ギムザ染色してコロニーを計測し、陰性対照群のコロニー数に対する割合(コロニー形成率)を算出した。試験は、0、6.25、12.5、25、50、100%試験液について実施した。陽性対照物質として Zinc diethyldithio carbamate (ZDBC) を用いた。

3) 細胞毒性試験・MTS 法

V79 細胞を 96-well プレートに播種し (1 × 10⁴ cells / 0.1 mL / well)、24 時間後に被験液 0.1mL を添加し、さらに24時間及び48時間培養した。培地を除去後、100 μL の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 μL の CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5% CO₂ インキュベーターで 37°C、1 時間反応した。生成されるフォルマザンをマイクロプレートリーダー (490 nm) で測定し、対照群に対する割合(生存率)を算出した。試験は、0、3.13、6.25、12.5、25、50、100%試験液について (final 0、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50%) 実施した。陽性対照物質として、ZDBC を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト全血を用いることから、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会に申請を出し、承認を受けた上で実施した。試験に用いる材料として、本研究グループにおいて検討に用いている、既存の陽性及び陰性材料と生体適合性の優れた新規材料を用い、収集する基礎データが、新規評価手法の開発にも役立つよう配慮した。

C. 研究結果

1. PHEMA、PMEA、MPC シートを用いた予備試験

予備試験では、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPC シートについて血液適合性試験を実施し、0 時間（シートなし）及び2 時間インキュベーション後のサンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として β -TG の測定、補体系の評価項目として、C3a 及び SC5b-9 の測定を行い、後から C5a の測定を追加した。

表 1 に溶血試験の結果を示した。いずれのシートも溶血率は 2% 以下であり、溶血性なしと判定された。ABS 540 nm においても ABS 576 nm と同様の結果が得られた（data not shown）。凍結保存しておいた血液サンプルを用いて、ELISA 法により TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。サンプルはそれぞれ検量線に乗るよう希釈して実施した（TAT : x 1、 β -TG : x 1050、C3a : x 2000、C5a : x 50、SC5b-9 : x 10）。図 6 に TAT 及び β -TG の結果を示した。2 時間インキュベーション後、シートなしでは TAT が低く、次いで PMEA、MPC がシートなしの 4 倍程度、PET、PC（未コート）が 6 倍程度、PHEMA が一番高く 8 倍程度であった。 β -TG では、PMEA はシートなしよりも低く、次いでシートなし、PHEMA、MPC が PMEA の 2 倍程度、PET、PC が高い値を示し、PC が一番高かった。補体系について測定した結果を図 7 に示した。当初 C3a 及び SC5b-9 を測定したが、C3a においては、2 時間インキュベーション後、PHEMA が一番高かったものの、シートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPC のすべてにおいて高い値が得られ、SC5b-9 の結果と異なっていたことから、C5a の ELISA

キットを追加入手して測定した。SC5b-9 では、シートなし、PET、PC（未コート）PMEA、MPC で値に大きな差はなく、PHEMA においてのみ高い値が得られた。C5a に関しては、全体に血漿中における量が少なかったが（添付の血漿コントロールにおいても同様）、シートなし、PMEA が同程度で低く、MPC が中間、PET、PC（未コート）、PHEMA がシートなしの 1.6-1.8 倍高いという結果が得られた。

2. 混合比の異なる MEA/HEMA シートを用いた本試験

予備試験の結果、被験シートを用いて血液適合性試験の各試験項目測定が可能であることが分かったので、サンプル数を増やして、混合比の異なる MEA/HEMA シートに対する試験を実施した。PET、PC（未コート）、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEA、MPC シートについて実施し、0 時間（シートなし）及び2 時間インキュベーション後のサンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として β -TG の測定、補体系の評価項目として C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。

表 2 に溶血試験の結果を示した。予備試験同様、いずれのシートも溶血率は 2% 以下であり、溶血性なしと判定された。ABS 540 nm においても ABS 576 nm と同様の結果が得られた（data not shown）。次に、凍結保存しておいた血液サンプルを用いて、ELISA 法により TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。サンプルはそれぞれ検量線に乗るよう希釈して実施した（TAT : x 10、 β -TG : x 420、C3a : x 300、C5a : x 60、SC5b-9 : x 20）。図 8 に TAT 及び β -TG の結果を示した。TAT は予備試験に比べて被験シート群で高い値が得られた。TAT 及び β -TG では、混合比の異なる

MEA/HEMA シート間で M50H50、M75H25 が低く大まかな傾向が似ていた。補体系について測定した結果を図 9 に示した。C3a においては、予備試験と同様に、2 時間インキュベーション後、シートなし、PET、PC (未コート)、MEA/HEMA シート、MPC のすべてにおいて高い値が得られた。その中では僅かであるが PHEMA が一番高かった。C5a では、シートなし、M75H25、PMEA、MPC が同程度で低く、次いで、M25H75、M50H50 が同程度、PET、PC (未コート)、PHEMA の順に高くなった。C5a でも PHEMA が一番高かった。SC5b-9 では、シートなし、PMEA が低く、次いで MPC、PC (未コート)、M75H25、PET、M50H50、M25H75、PHEMA の順で高くなり、PHEMA はシートなしの 3.4 倍高いという結果が得られた。

3. V79 細胞を用いた細胞毒性試験

V79細胞を用いて、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い細胞毒性試験を実施した結果、コロニー法において PC (未コート)、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEA すべてのシートにおいて、100%試験液を含むいずれ濃度においても細胞毒性は観察されなかった

(図10)。また、MTS法においても、100%試験液 (final 50%被験液) を含むいずれの濃度においても、細胞毒性は観察されなかった (図11)。オプションとして、MTS法において、コロニー法と同様に、96 wellから培地を除き、0.1 mLの100%試験液又は培地を添加して、24及び48時間後にアッセイを行ったが、細胞毒性は観察されなかった (data not shown)。

D. 考察

血液適合性試験の実施において、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補

体系において標準的な評価項目として挙げられていたもののうち、TAT、FPA、 β -TG、PF4、C3a、C5a、SC5b-9 の測定には免疫検定法 (ELISA) が推奨されるため、使用できる動物種が限定される。これらの項目に対する ELISA キットがヒトの臨床検査用に開発されているものが多いことから、ヒトの血液による試験系の設定が必要になる。標準的な評価項目として挙げられている因子や活性化産物が分解しやすいなど、半減期が短いことから、それぞれの測定項目に合わせたサンプリングが必要となった。今回、血液凝固因子測定用にはクエン酸処理、血小板因子測定用には CTAD 処理、補体系測定用には EDTA、Futhan 処理を行ったサンプルを用いて測定を行った結果、実際にこれらの処理により ELISA で検出可能で、各因子や活性化産物が分解していないことが確認でき、また、被験試料により値に差が観察できた。

被験試料と血液とのインキュベーションを行うにあたり、ガラスチューブについても検討を行ってみたが、ガラスチューブではシートなしでインキュベーション 1 時間目血栓が観察された。今回の実験では、PP チューブを用いて試験を実施したが、試験に用いるチューブの材質の影響についての検討、タイムコースなど基礎的なデータを取る必要がある。また、採血時に、組織因子を含む血液を除くため、初めの 3-4 mL を別の注射筒で取ってから試験用の採血を行ったが、組織因子を含む血液が、in vitro の血液適合性試験において、実際にどの程度影響があるかについても確認しておく必要があると思われる。

本研究の 2 回の血液適合性試験の結果について比較したところ、TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 の 5 項目に関しては、2 回の試験の値のオーダーが揃っていたが、TAT については予備試験に比べて、本試験では