

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、分子動力学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、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 μ L でスピンコート (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 cm^2 / 1 mL 全血) と 37、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) サンプルング

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ルングした (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 μ g/mL) 添加 EDTA-2K 含有チューブ (テルモ) にサンプルングし、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 で保存した。溶血性試験は、全血をそのままサンプルングして用いた。

4) 溶血性試験

各時間にサンプルングした全血を、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 法ではシュウ酸処理血、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に希釈して実施した (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に希釈して実施した (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

全体に値が高く、共通に被験シートがあるものでデータを比較してみると、シートなしで6.5倍、他ではPMEA3倍～PET9倍の差があった。この理由として、予備試験と本試験において、採血方法、インキュベーション時における振盪方法等を変更しており、それらが影響している可能性が考えられた。また、採血時の血液の状態などが、特定の因子の活性化に参与している可能性も考えられる。今後、追試験等を進めていくことで、各評価項目に影響を与える要因について、背景データ、被験物質に対する感受性の違いなどについて情報を得ることが出来るのではないと思われる。

2回の試験において、共通にデータが得られているシートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの結果について比較検討した。TATでは、シートなしが低く、PMEA、MPCがPET、PC（未コート）、PHEMAに比べて低い傾向は共通であった。β-TGでは、シートなし、PMEA、MPCが他の被験シートに比べて低いという結果は共通であった。C3aでは、0時間のみが低く、2時間インキュベーション後、シートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの値はいずれも高かったが、その中では、PHEMAが一番高いという結果が共通していた。C5aでは、シートなし、PMEA、MPCが他の被験シートに比べて低く、PHEMAが一番高いという結果が共通していた。SC5b-9については、シートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの結果がほとんど一致しており、PHEMAの値だけが高く、他のデータの順はPMEA、MPC、シートなし、PC（未コート）、PETの順で共通していた。2回の試験の比較においては、5項目において、一部結果が異なる場合もあったが、全体に共通の結果が得られており、その中でも補体系の3項目は再現

性が高い結果が得られていた。

混合比の異なるMEA/HEMAシートを用いた本試験における5項目の測定結果を比較検討した。C3aを除くTAT、β-TG、C5a、SC5b-9において、MEA/HEMAの混合比と測定結果との間に関連が見られ、その傾向は2種類に大別された。TAT、β-TGでは、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25の順に値が小さくなる傾向があり、PMEAではM50H50、M75H25に比べると高い値になり、U字カーブを描いていた。これに対して、C5a、SC5b-9では、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEAの順に値が小さくなる傾向があり、右下がりのカーブを描いていた。PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25間でHEMAの比率が増えるに従って値が増加する傾向は、TAT、β-TG、C5a、SC5b-9の4項目において、共通に観察された。

今後は、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、組織因子を含む血液の影響等、各試験法の特徴について検証を進めるための基礎的なデータの収集を続ける予定である。C3aに関しては、補体系の中でも3径路により活性化されC3a、C5a、SC5b-9の中でも初期の産物であることから、活性化が起こりやすい可能性が考えられた。今後、C3aに加えて、C3a-desArgのELISA等も検討してみる予定である。混合比の異なるMEA/HEMAシートを用いた試験については、再現性について確認試験を行う。引き続きPMEA、PHEMA、MPCポリマー等の高分子材料に対して、血液適合性試験を実施し、各試験法の特徴、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する予定である。

E. 結論

本研究において、血液適合性試験の各評

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、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、混合比の異なる MEA/HEMA、MPC 等の高分子材料を被験試料として、実際に、血液適合性試験を実施した結果、

- TAT は両試験間で、値が異なっていた。
- 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、各試験法の特長、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。

本研究の遂行にあたり、血液適合性試験の実施方法についてご指導いただきました、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性学研究室の新藤智子先生に感謝

致します。

F. 研究発表

1. 論文発表

Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A., Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos J. Toxicol. Sci. (in press)

2. 学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)
- 2) 宮島敦子、加藤玲子、小森谷薫、新見伸吾：生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）
- 3) 加藤玲子、薮島由二、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（船堀、2013.11）
- 4) 加藤玲子、佐藤正人、岡田恵里、阿久津英憲、小久保舞美、河毛知子、宮島敦子、梅澤明弘、持田譲治、新見伸吾：多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響 第 27 回日本軟骨代謝学会（京都、2014.2）

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【試験ガイドライン】

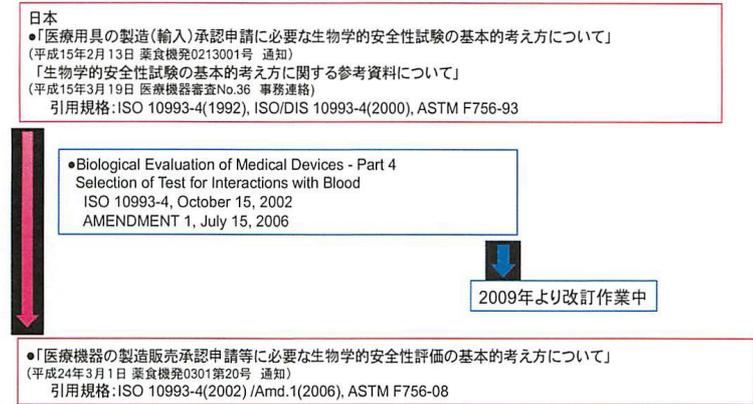


図1 血液適合性試験に関する通知

試験項目	評価項目
1 血栓形成	付着物/ 付着状態
2 血液凝固	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)
3 血小板	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)
4 血液学的項目	全血算 (CBC) 溶血
5 補体系	補体活性化産物 (C3a) 補体活性化産物 (C5a) 補体活性化産物 (SC5b-9)

「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 平成24年3月1日)より

図2 血液適合性試験における標準的な評価項目

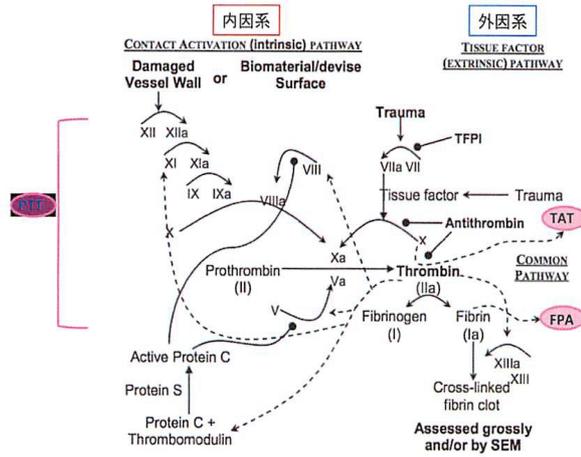
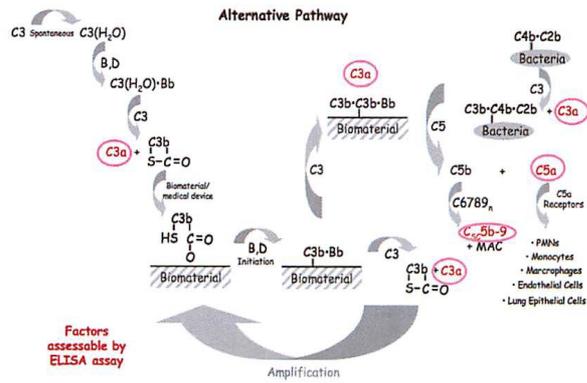


Figure B.1 — The coagulation cascade

ISO/WD 10993-4(2013)に追記

図3 血液凝固系カスケードと評価項目



ISO/WD 10993-4(2013)に追記

図4 補体系と評価項目

ヒト全血(ヘパリン2 U/mLを含む)と被験試料(6 cm² /1mL血液)を、37℃、2時間、緩やかに振盪(60 rpm)後、各試験項目に応じて血液をサンプリング。

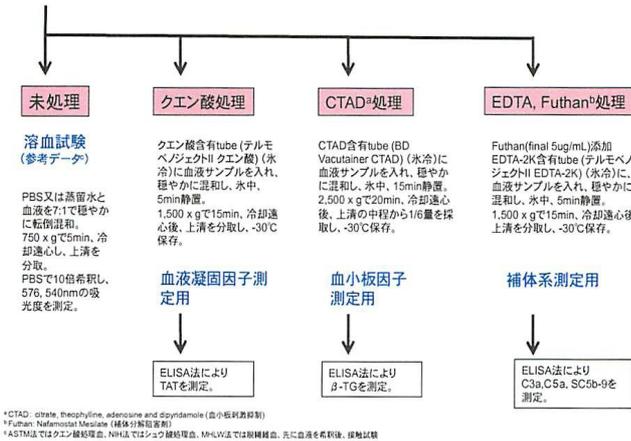


図5 血液適合性試験の実施方法の概略

表1 予備試験における溶血率

	ABS (576nm) mean		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.035	0.895	
no sheet	0.033	0.995	
PET	0.036		0.26
PC	0.033		0.00
PHEMA	0.034		0.05
PMEA	0.034		0.05
MPC	0.030		0.00

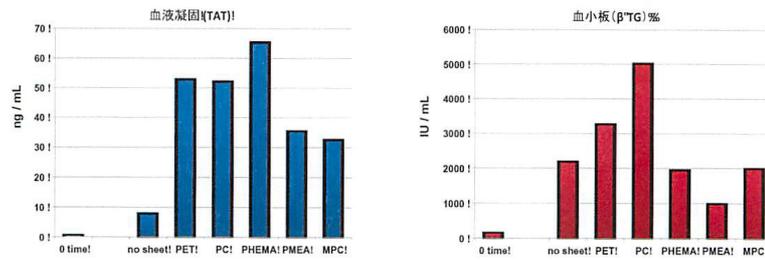


図6 予備試験における血液凝固系(TAT)及び血小板(β-TG)の活性化

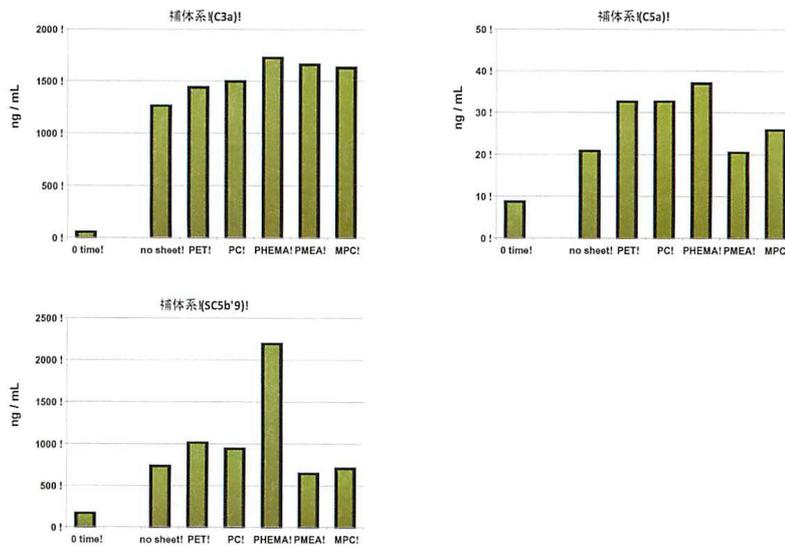


図7 予備試験における補体系(C3a, C5a, SC5b-9)の活性化

表2 本試験における溶血率

	ABS (576nm) mean		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.034	0.923	
no sheet	0.033	0.965	
PET	0.033		0.00
PC	0.035		0.16
PHEMA	0.040		0.70
M25H75	0.035		0.21
M50H50	0.036		0.27
M75H25	0.034		0.11
PMEA	0.035		0.16
MPC	0.035		0.16

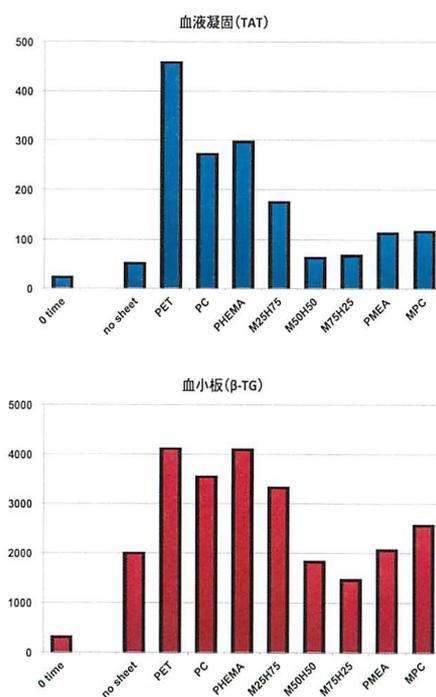


図8 本試験における血液凝固系(TAT)及び血小板(β-TG)の活性化

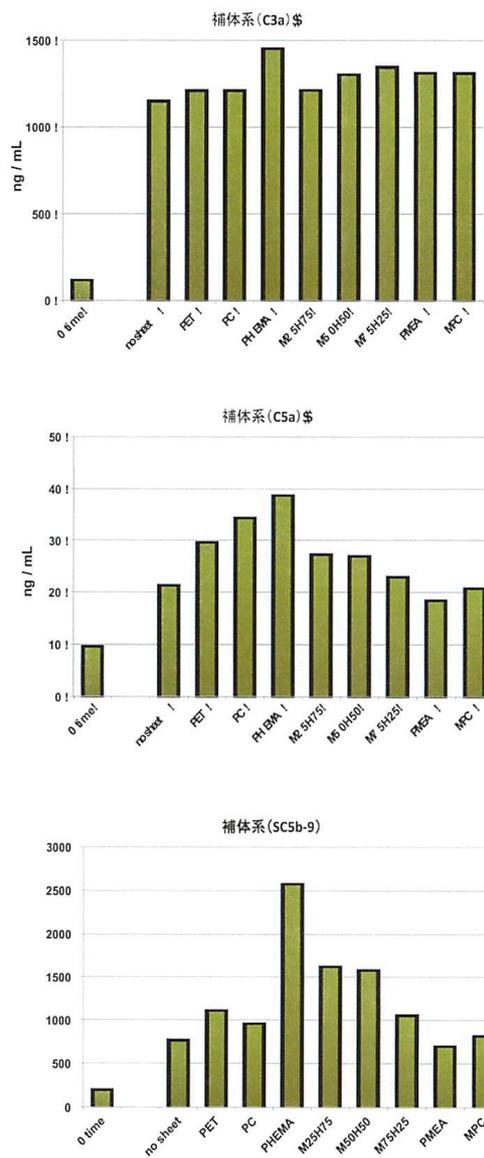


図9 本試験における補体系(C3a, C5a, SC5b-9)の活性化

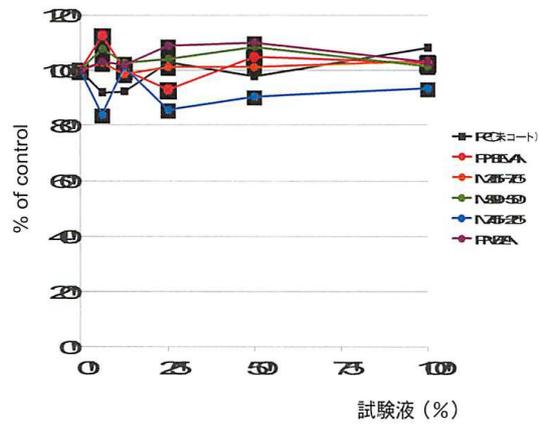


図10 V79細胞を用いた細胞毒性試験(コロニー法)

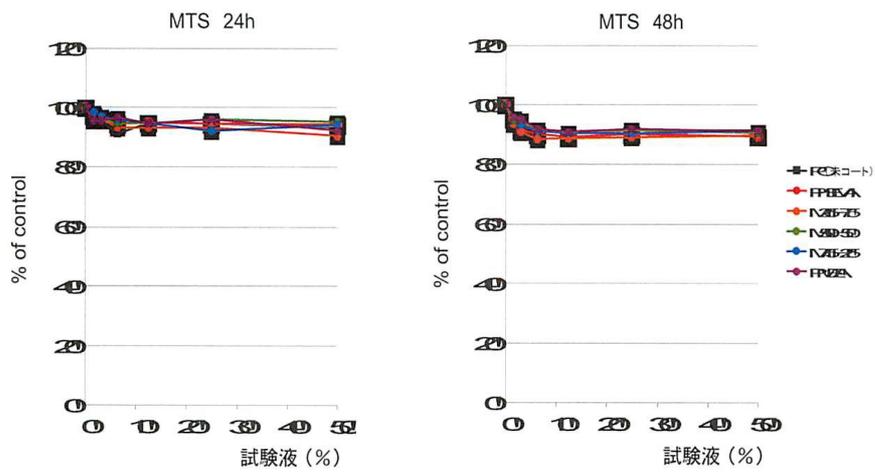


図11 V79細胞を用いた細胞毒性試験(MTS法)