

分担研究報告書

平成 26 年度厚生科学研究費補助金/地球規模保健課題解決推進のための研究事業
医療機器規格の国際標準化を支援する体制構築に関する研究 (H25-地球規模-指定-008)

分担研究課題名

医用材料規格の新規提案に向けた検証実験に関する研究

研究分担者 齋島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

研究協力者

野村祐介	国立医薬品食品衛生研究所	坂口圭介	テルモ株式会社
福井千恵	国立医薬品食品衛生研究所	谷川隆洋	テルモ株式会社
中村義一	株式会社リボミック	杉山知子	テルモ株式会社
宮川 伸	株式会社リボミック	竹ノ内美香	テルモ株式会社
金 玲	株式会社リボミック	新藤智子	食品薬品安全センター
柚場俊康	川澄化学工業株式会社		

研究要旨

本研究では、新規規格の提案や国際規格の改定作業を通じて国際標準化に必要な戦略等に関する情報を収集することを目的として、試験法及び材料開発分野において 2 件のケーススタディを実施した。

試験法分野のケーススタディでは、ISO/TC194/WG9 において実施されている溶血性試験国際ラウンドロビンテストを支援するため、2 種類の弱陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シート (Y-2, Y-3) を本試験用標準品として提供した。Y-2 及び Y-3 は本試験においても良好な溶血特性を示し、その性能が世界的に確認されたことから、今後、ISO/TC194/WG12 に国際標準品として新規提案する。

材料開発分野におけるケーススタディでは、機能性蛋白質を選択的に捕捉する RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の開発研究を行った。その結果、bFGF 捕捉型 RNA アプタマー (1p01) 固定化表面は細胞増殖促進機能を有することが確認されたことから、RNA アプタマーを利用することにより、医用材料に意図した機能を付与できることが明らかとなった。また、BMP2 捕捉型 RNA アプタマー候補の選定を行った結果、B10 と B24 が有力な候補となることが判明した。

A. 研究目的

本研究では、新規規格の提案や国際規格の改定作業を通じて、国際標準化に必要な戦略等に関する情報を収集することを目的として、医療機器関連業界と連携のもと、試験法分野及び材料開発分野におけるケーススタディを実施している。

試験法分野のケーススタディでは、ISO/TC194/WG9 が実施している溶血性試験

に関する多施設国際共同検証試験(ラウンドロビンテスト)を支援している。血液に接触する医療機器には安全性上の不具合を生じないように、ISO 10993-4 において規定される血液適合性評価が求められているが、具体的且つ標準化された試験法が明記されていない点が大きな課題となっている。ISO 10993-4 文書としては、2002 年及び 2006 年に本体と Amendment がそれぞれ

れ発行されたが、現在、ISO/TC194「医療機器の生物学的評価」技術委員会では、WG9が主体となって同文書の改訂作業を行っており、日本も積極的に参画している。溶血性試験の国際ラウンドロビンテストは、その一環として行われており、平成26年度に本試験が実施された。

過去に行ったパイロット試験において、WG9が配布した弱陽性対照材料は標準品として十分な性能を発揮しないことが確認された。そこで、我々が開発した2種類の弱陽性対照材料（Genapol X-080含有PVCシート¹⁾）を提供し、ミニテストを実施した結果、良好な成績が得られたため、国際ラウンドロビンテストの本試験用標準品として、全参加国に配布した。

材料開発分野におけるケーススタディでは、機能性蛋白質を選択的に補足するRNAアプタマーを用いた革新的医用材料の開発研究を行っている。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。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。通常、材料表面への蛋白質吸着は受動的であり、その吸着挙動は材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。成長因子等の生理活性物質や抗体を固定化し、特定の機能を付与した表面も開発されているが、現在のところ、新しい医用材料として実用化には至っていない。一方、核酸医薬分野では特定の蛋白質を特異的に捕捉し、その活性を阻害するRNAアプタマーが医薬品として上市化されている。

SELEX法によりRNAアプタマー医薬品候補を検索する際、活性を保持した状態で

標的蛋白質を特異的に捕捉するRNAアプタマーが多数ヒットする。RNAの生体内寿命は非常に短い、相応の化学修飾を施すことにより、その寿命を延長することが可能となる。すなわち、適切なRNAアプタマーを医用材料上に固定化することにより、特定の蛋白質を特異的且つ能動的に材料表面に補足し、その機能を一定期間に渡り制御できる可能性が非常に高い。また、抗体や増殖因子等と異なり、RNAアプタマーは単独では生理活性を示さない合成可能な化学物質である利点もある。そこで材料開発分野におけるケーススタディでは、RNAアプタマーを用いた革新的医用材料の創製を目指し、生理活性を保持した状態でbFGF並びにBMP2を特異的に補足するRNAアプタマーを選定すると共に、RNAアプタマー固定化材料を作製し、その機能を解析した。

B. 研究方法

(1) ケーススタディ 1: ISO/TC194/WG9 溶血性試験ラウンドロビンテスト支援

1-1. 溶血性試験用弱陽性対照材料の調製

100 パーツの PVC に対して、DEHP 55 パーツ、ESBO 8 パーツ、ステアリン酸カルシウム及びステアリン酸亜鉛 0.05 パーツのほか、1.0 及び 1.5 パーツの Genapol X-080 を含有する 2 種類の可塑化 PVC パウダーを調製した。Genapol X-080 含有 PVC シート (Y-2 及び Y-3: 厚さ 0.4 mm) は同パウダーを利用してヒートプレス法 (180°C) により作製し、本試験用標準品として WG9 に提供した。

1-2. 溶血性試験ラウンドロビンテスト

1-2-1. 試験材料及び方法

ISO/TC194/WG9 から配布された 6 種類

(Polyethylene: PE, Nitrile glove: NG, Latex glove: LG, Buna rubber: BR, Y-2, Y-3) の材料を使用した。各試験法のインキュベーション時間は、ラウンドロビンテスト用プロトコルに従い、ASTM法²⁾(直接接触及び抽出液法):3時間、NIH法³⁾(直接接触法):1時間、MHLW法^{4,5)}(抽出液法):4時間とした。血液試料としては、ウサギ血液及びヒト血液を使用した。

国内からは、テルモ株式会社と食品薬品安全センターの2施設が参画し、それぞれ独立して試験を実施した。なお、海外からは11施設が参画した。

1-2-2. 倫理面への配慮

動物血液の採取については、所属機関が規定する動物実験指針に従い、動物に対する苦痛が最小となるよう務めた(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団/動物実験実施施設認証認定番号:食品薬品安全センター/12-005、テルモ/12-030)。動物実験にあたっては、動物実験倫理委員会の承認を得て実施した(食品薬品安全センター/承認番号 114002A、テルモ/承認番号 140070)。食品薬品安全センターにおいて実施したヒト血液を使用した試験は同センター倫理審査委員会の承認を得て行った(承認番号:H2014-01A)。テルモはヒト血液を使用した製品評価(血液適合性評価)を実施するにあたり、社内倫理委員会による審査を必要としない。

(2) ケーススタディ 2: RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製

3-1. bFGF を捕捉する RNA アプタマー材料開発

昨年度選定した bFGF 捕捉型 RNA アプタマー (1p01) 及び陰性対照である poly dT

(pdT) は、ジーンデザインに合成を委託し、末端に 3'-アミノ CA リンカーを付加した。両末端にそれぞれ SH 基とカルボキシル基を有するポリエチレングリコール 5000 (PEG5k) を常法に従って、金コートしたガラス板上に固定化した後、カルボジイミド法により、1p01 及び pdT を結合させた。作製した両ガラス版を 70% EtOH に浸漬後、風乾させて殺菌し、細胞培養用 24 ウェルプレートに設置した。培地としては DMEM 及び MSCGM を使用し、血清は 5% ヒト血清 (HS) 及びウシ胎児血清 (FBS) を用いた。各培地で 30 分間プレインキュベーションした後、マウス線維芽細胞 (NIH3T3: 5.4×10^3 cell/well) 又はヒト間葉系幹細胞 (hMSC: 9.0×10^3 cell/well) を播種し、5% CO₂ 雰囲気下 37°C で培養した。hMSC は培養開始から 2 日後、NIH3T3 は培養開始 3 日後に固定化し、Hoechst 33258 (Ex=360 nm, Em=460 nm) により染色後、BZ-9000 を用いて核数を計測することにより、細胞増殖能を評価した。

3-2. BMP2 を捕捉する RNA アプタマー材料開発

3-2-1. RNA アプタマー候補の選定

BMP2 結合能を有する RNA アプタマー候補の選定は、BMP2 をアミノカップリングさせた NHS 樹脂を用いる SELEX 法により行なった。テンプレート DNA、フォワードプライマー及びリバースプライマーはジーンデザインに合成委託し、これらを用いて RNA プールの転写合成を行なった。RNA にヌクレアーゼ耐性を付与するため、ピリミジン残基のリボースに 2'F 修飾を施した dNTP を取り込める DuraScribe T7 Transcription Kit (エアブラウン) を用い、転写反応を行なった。転写産物を簡

易精製し、SELEX buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 145 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) 条件下で tRNA 等の競合物質と共に BMP2 固定化樹脂と混合し、結合した RNA を回収・精製した。回収した RNA を逆転写反応により DNA に戻し、PCR によって増幅させ、DNA を精製した。この DNA を用いて再度転写を行なうことにより、次のラウンドの RNA プールを合成した。このサイクルを合計 10 ラウンド繰り返し、最終ラウンドの PCR 産物を TOPO ベクターにクローニングし、シークエンス解析を行なった。解析結果を ClustalW によってグルーピングすることで、RNA アプタマー候補を取得するための評価を行った。得られた候補配列について、プログラム Mfold 及び RNAfold を用いて二次構造解析を行ない、BMP2 結合に重要な構造モチーフを検索した。

3-2-2. RNA アプタマー候補の BMP2 結合能評価

SELEX 法によって得られた RNA アプタマー候補と BMP2 の結合能を電気泳動移動度シフトアッセイ法 (EMSA) 及び表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて評価した。

EMSA では Mg イオンの有無の違いによる影響を評価するために、TB (89 mM Tris, 89 mM Borate) 及び TBM (89 mM Tris, 89 mM Borate, 1 mM MgCl₂) を泳動用緩衝液として使用した。RNA と BMP2 の混合比は 1:0 及び 1:5 とし、12% 非変性 PAGE によって RNA アプタマー候補と BMP2 の結合能を評価した。

SPR 解析は BIAcore3000 を用いて行ない、ランニング緩衝液及びセンサーチップとして、それぞれ SELEX buffer 及びストレプトアビジン固定化チップ (SA チップ)

を使用した。同チップに 5'末端ビオチン標識 pdT (16 nt) を 100 Resonance Unit (RU) 程度結合させた後、リガンドとなる 3'末端に Poly A を付加した候補 RNA を poly A/pdT 間の相互作用を利用して SA チップに固定化した。候補アプタマーと BMP2 との結合能は同チップを利用して評価した。

C. 研究結果

(1) ケーススタディ 1 : ISO/TC194/WG9 溶血性試験ラウンドロビンをテスト支援

総計 13 施設において試験を実施したが、集計が完了していないため、国内施設が行った試験結果を示す。

1-1. 陰性対照及び強陽性対照の試験結果

図 1a に示したとおり、陰性対照材料である PE は、ヒト血液及びウサギ血液を利用した評価系ともに、全ての試験法において溶血能を示さなかった。

強陽性対照材料である NG は、ヒト血液及びウサギ血液を利用した評価系において、ASTM/直接接触法及び ASTM/抽出液法とともに、ほぼ 100%の溶血率を示した (図 1b)。NIH/直接接触法の場合、ウサギ血液を利用した評価では完全溶血が観察されたが、ヒト血液を使用した試験系の溶血率は若干低く、51.4%であった (図 1b)。一方、NG の溶血特性をウサギ血液及びヒト血液を利用した MHLW/抽出液法により評価した時の溶血率は、それぞれ 6.6%及び 2.0%であった。

1-2. 弱陽性対照材料の試験結果

図 2a に示したとおり、LG の溶血特性を最も感度良く検出できる試験法は NIH/直接接触法であり、ウサギ血液及びヒト血

液を利用した試験系における溶血率は、それぞれ 30.5%及び 13.5%に達した。LG の溶血特性は ASTM/直接接触法においても探知可能であった（ウサギ血液：7.6%，ヒト血液：7.7%）。一方、抽出液法は LG の溶血特性を十分探知できず、ASTM/抽出液法及び MHLW/抽出液法において観察された溶血率（ウサギ血液/ヒト血液）は、それぞれ 2.6%/0.5%及び 0.6%/0.3%であった。

図 2b に示したとおり、BR の溶血特性は ASTM/直接接触法において最も感度良く検出された（ウサギ血液：6.9%，ヒト血液：4.9%）。ASTM/抽出液法、NIH/直接接触法及び MHLW/抽出液法における溶血率（ウサギ血液/ヒト血液）は、それぞれ 2.3%/0.9%、3.4%/1.1%及び 0.5%/0.5%であった。

図 3a に示したとおり、ASTM 法は Y-2 の溶血特性を感度良く検出することが可能であり、直接接触法及び抽出液法における溶血率（ウサギ血液/ヒト血液）は、それぞれ 9.3%/8.8%及び 13.1%/12.7%であった。NIH/直接接触法と MHLW/抽出液法の感度は、ほぼ同等であり、両試験法において観察された溶血率（ウサギ血液/ヒト血液）は、それぞれ 3.0%/3.0%及び 1.0%/2.5%であった。

Y-3 は ASTM/抽出液法及び MHLW/抽出液法において強溶血を示し、両試験法における溶血率（ウサギ血液/ヒト血液）は、それぞれ 94.5%/95.1%及び 86.3%/86.6%に達した（図 3b）。直接接触法による検出感度は抽出液法と比較して低く、ASTM/直接接触法及び NIH/直接接触法における溶血率（ウサギ血液/ヒト血液）は、それぞれ 49.7%/39.9%及び 15.6%/11.9%であった。

(2) ケーススタディ 2：RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製

3-1. bFGF 捕捉型 RNA アプタマー材料開発

昨年度、bFGF の生理活性を阻害せずに bFGF を捕捉する RNA アプタマー候補である 1p01、1p02 及び 2p03 を選定した。また、金コートしたガラス板表面に PEG5k を介して pdT を固定化させることにも成功している。そこで、金コートしたガラス板に PEG5k 及び 1p01 又は pdT を固定化した材料が及ぼす細胞増殖能への影響を評価した。

bFGF 捕捉型 RNA アプタマー 1p01 及び陰性対照である pdT をコートした材料上で細胞培養を行なった結果、5% HS 条件下では培地の種類を問わず、NIH3T3 及び hMSC とともに、1p01 コート材料上で培養した方が高い増殖能を示すことが確認された（図 4）。また、5% FBS/DMEM 培地条件下で hMSC を培養した場合にも、1p01 コート材料は増殖促進作用を示したが、5% FBS/MSCGM 培地条件下の場合、1p01 及び pdT コート材料は同等の増殖能を示した（図 5）。

3-2. BMP2 捕捉型 RNA アプタマー材料開発

3-2-1. RNA アプタマー候補の選定

BMP2 に結合する RNA 候補を SELEX 法によって選定し、72 クロウンの配列解析を行った後、ClustalW を用いたグループ解析を行なった結果、BMP2 と結合する RNA アプタマー候補は 5 種類（B10, B20, B24, B32, B37）の配列に収束されていることが明らかとなった。B10, B20, B24, B32 及び B37 の出現頻度は、それぞれ 6.9%, 16.9%, 8.5%, 45.1%及び 12.7%であり、B32 が最も多く観測されていた。この 5 種類の候補についてプログラム Mfold 及び

RNAfold による二次構造解析を行なった結果、それぞれ図 6 に示した構造を形成していることが予測された。

3-2-2. RNA アプタマー候補の BMP2 結合能評価

SELEX 法によって得られた 5 種類の RNA アプタマー候補と BMP2 の結合能を EMSA により評価した結果、二価イオン非存在下では、BMP2 を添加することにより、スメアな複合体バンドが観測された。一方、 Mg^{2+} イオン存在下で EMSA を行なった結果、B10 及び B24 については、明瞭な複合体バンドが観測された (図 7)。

BIAcore を用いた SPR 法による解析の結果、RNA アプタマー候補に BMP2 を添加することにより、例外なく RU 値の上昇が確認されたことから、5 種類の RNA アプタマー候補は、いずれも BMP2 に結合することが判明した (図 8)。

D. 考 察

(1) ケーススタディ 1 : ISO/TC194/WG9 溶血性試験ラウンドロビンテスト支援

ラウンドロビンテストのプロトコルは、医療機器の溶血性試験のために国際的に広く用いられている ASTM 法、NIH 法及び MHLW 法の 3 法から構成されている。NG は強陽性対照材料であるが、MHLW/抽出液法の検出感度は、その他の試験法と比較して大きく劣ることが確認された。LG 及び BR は主に直接接触法における弱陽性対照材料として配布された試料であり、本試験においても、その溶血特性が明瞭に示された。これらの現象は、事前に行ったパイロット試験においても確認されている。

一方、我々が提供した Y-2 及び Y-3 は、直接接触法及び抽出液法のいずれにおい

ても弱陽性対照材料として利用することが可能であり、試験法に応じて、両者を使い分けることにより、試験系の評価を行うことができることが判明した。

ウサギ血液とヒト血液は多くの試験法において、ほぼ同等の感度を示した。しかし、NIH/直接接触法では、ウサギ血液を利用した試験系の方が感度的に優れていることが確認された。

(2) ケーススタディ 3 : RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製

本研究では、RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製を目指し、生理活性を保持した状態で増殖因子である bFGF 及び BMP2 を捕捉する RNA アプタマーを選定し、新規医用材料としての有用性を評価した。

bFGF 捕捉型 RNA アプタマー-1p01 及び陰性対照である pdT を材料表面上に固定化し、両材料上で細胞培養を行なった。その結果、5% FBS/MSCGM 培養条件下の場合、hMSC の増殖能は pdT 及び 1p01 間に顕著な相違は観察されなかった。この現象は、hMSC 増殖用に最適化された MSCGM 培地に含まれる増殖因子が同細胞に優先的に作用し、RNA アプタマーによる効果が減弱したことに由来すると思われる。一方、その他の培養条件下においては、陰性対照である pdT と比較して、1p01 コート材料表面上で細胞数が多く観測されていることから、同材料は細胞増殖促進効果を有していることが示唆された。今後、同材料表面上の吸着蛋白質解析等を行うと共に、本 RNA アプタマーとコラーゲンとの複合材料を作成し、ラット埋植試験等を実施することにより、医用材料としての有用性を検証する。

BMP2 に対する RNA アプタマーを用いた新規骨充填剤の開発を目指し、SELEX 法により BMP2 に結合する RNA アプタマー候補の選定を行なった。得られた RNA アプタマー候補の解析を行なった結果、5 種類の配列に収束していたが、共通の構造モチーフが認められなかったことから、各候補はそれぞれ特有の構造を有していることが示唆された。RNA アプタマー候補と BMP2 の相互作用を EMSA によって解析した結果、 Mg^{2+} イオンの有無により、その挙動が異なっていた。B10 及び B24 は Mg^{2+} イオン存在下において、明瞭な複合体バンドとして検出された。これは、 Mg^{2+} イオンが両 RNA アプタマー候補と BMP2 の結合に密接に関与することを示唆している。一般的な機能性 RNA の構造形成には二価の金属イオンが関与する場合が多く、ヒト IgG に対する RNA アプタマーにおいても複合体形成に Mg^{2+} もしくは Ca^{2+} イオンが必要となっている。一方、SPR 法による相互作用解析において、SELEX 法と同様に二価又は一価の金属イオンを添加した条件下で評価した結果、5 種類の RNA アプタマー候補は BMP2 に対して、40N ランダム配列よりも強い結合能を有することが確認された。本研究において使用した SELEX の条件下では、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 及び Na^{+} イオンが共存しているため、B10、B24 以外の RNA アプタマー候補については、 Mg^{2+} イオンとは別のイオンに依存した構造形成能を有する可能性も示唆された。また、EMSA 及び SPR 解析において、40N ランダム配列の RNA は非常に弱い BMP2 結合能を有することが確認されたが、この現象は BMP2 に存在する塩基性アミノ酸に富んだ正電荷領域と、負電荷を帯びている RNA との非特異的な静電相互作用に由来すると思われる。今

回得られた 5 種類の RNA アプタマー候補は、二次構造予測の結果から保存された構造モチーフが確認されないと共に、相互作用解析における挙動が異なることから、それぞれが異なる機構で BMP2 と結合していることが示唆された。RNA アプタマーを利用した医用材料の開発に応用するためには、BMP2 の生理活性を阻害しない配列が必要であるため、今後、5 種類全ての RNA アプタマー候補を用いて、BMP2 シグナル伝達阻害等の評価を行う。また、二次構造予測の結果に基づいて短鎖化した RNA アプタマーについても同様の解析を行うと共に、金属イオン依存性についても検討する。

E. 結 論

(1) ケーススタディ 1 : ISO/TC194/WG9 溶血性試験ラウンドロビンテスト支援

我々が開発した弱陽性対照材料 (Y-2 及び Y-3) は、直接接触法及び抽出液法のいずれにおいても弱陽性対照材料として利用することが可能であり、試験法に応じて、両者を使い分けることにより、試験系の評価を行うことができることが判明した。Y-2 及び Y-3 の対照材料としての性能が世界的に確認されたことから、今後、強陽性対照材料である Y-4 と合わせて、ISO/TC194/WG12 に国際標準品として新規提案する。

(2) ケーススタディ 2 : RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製

bFGF 捕捉型 RNA アプタマー 1p01 は、細胞増殖促進機能を有することが確認されたことから、新規医用材料の開発において有益なツールになることが示唆された。また、BMP2 に結合する RNA アプタマー候

補として、5種類の有力な配列を選定することができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表等

- 1) Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A, Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung U, Ogawa K, Niimi S, Yoshida M. Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers. *J. Vinyl Add. Technol.*, in press (2015).
- 2) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 102B:1809-1816 (2014).
- 3) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, 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*, 102B: 721-728 (2014).
- 4) 靛島由二. 第1部：医療機器市場の拡大と新規製品の開発：開発，上市化，市場確保において留意すべきポイント. 生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略（監修：田中 賢）. *サイエンス&テクノロジー*, pp. 3-21 (2014).
- 5) 中岡竜介, 靛島由二, 新見伸吾. 医療機器・材料の国際標準化動向. *バイオマテリアル-生体材料*, 33(1):56-63 (2015).
- 6) 中岡竜介, 靛島由二, 新見伸吾. 橋渡し研究及び国際標準化の行政的支援. 第53回日本生体医工学会大会 (2014年6月・仙台).
- 7) 野村祐介, 福井千恵, 戸井田 瞳, 新見伸吾, 宮川 伸, 金 玲, 中村義一, 靛島由二. RNA アプタマーを用いた新規医用材料の開発. 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014年11月・船堀).
- 8) 野村祐介, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 杉山知子, 竹ノ内美香, 新見伸吾, 靛島由二. 簡易溶血性試験法の性能評価と公定法との比較検証. 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014年11月・船堀).
- 9) 靛島由二, 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, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑. 新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験. 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014年11月・船堀).
- 10) 靛島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 向井智和, 野村祐介, 伊佐間和郎¹, 新見伸吾. 新規血液バ

ツグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの性能評価. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会(2014年11月・船堀).

参照資料

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, 102B:1809-1816 (2014).
2. ASTM Standard F756-08:2008. Practice for assessment of hemolytic properties of materials. ASTM International, West Conshohocken, PA.
3. National Institute of Health: 1977. Evaluation of hemodialyzers and dialysis membranes. <Hemolysis-Rabbit Blood> DHEW Publication 77- 1294. Bethesda, MD.
4. 平成 24 年 3 月 1 日付け薬食機発 0301 第 20 号: 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「医療機器の製造販売承認申請等に必要生物学的安全性評価の基本的考え方について」.
5. Japanese domestic committee of ISO/TC 194. Haemocompatibility test. In: Matsuoka M, Editor-in-chief. Basic principles of biological safety evaluation required for application for approval to market medical devices (bilingual in Japanese and English). Tokyo: Yakuji Nippo, Ltd.; 2013. p189-203.

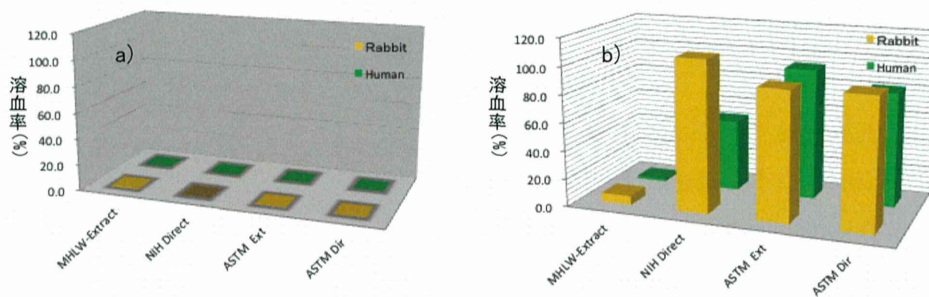


図1. 陰性対照材料及び陽性対照材料の溶血特性. a) PE, b) NG.

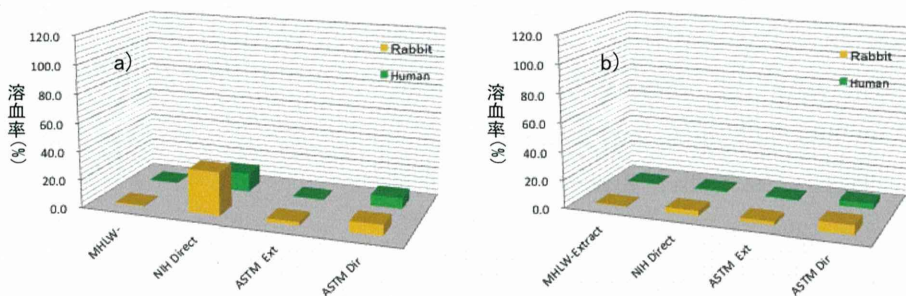


図2. 弱陽性対照材料の溶血特性. a) LG, b) BR.

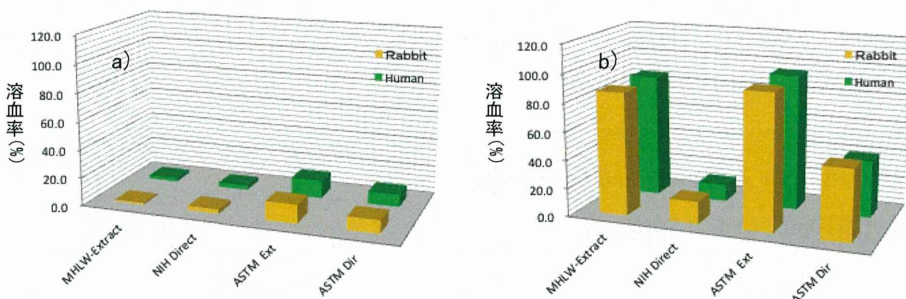


図3. 弱陽性対照材料の溶血特性. a) Y-2, b) Y-3.

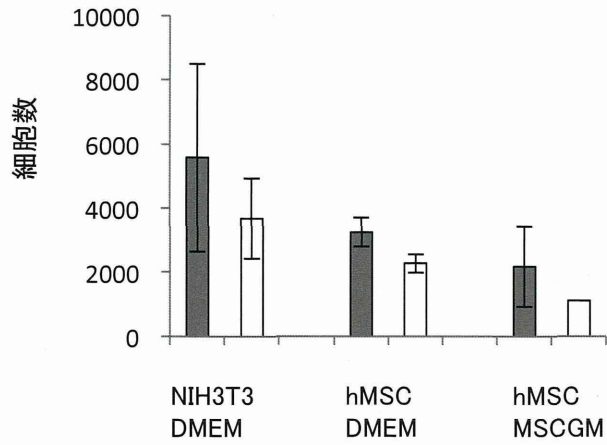


図4. アプタマー材料の細胞増殖能への影響評価 (5% HS). 黒:1p01, 白:pdT.

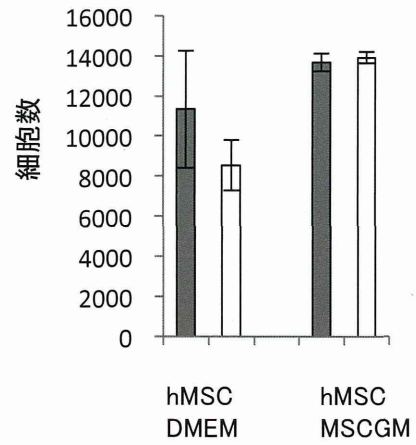


図5. アプタマー材料の細胞増殖能への影響評価 (5% FBS). 黒:1p01, 白:pdT.

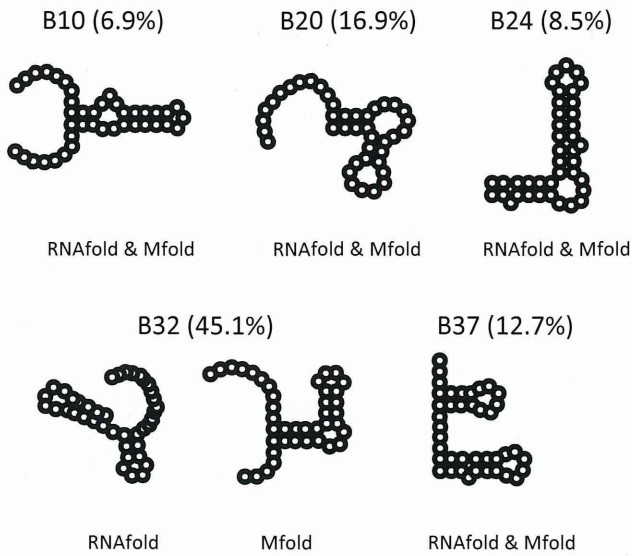


図6. SELEX法によって得られたRNAアプタマー候補の出現頻度と二次構造予測結果

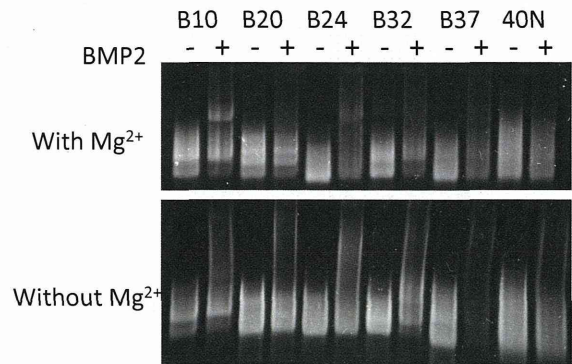


図7. EMSAによるRNAアプタマー候補とBMP2の相互作用解析

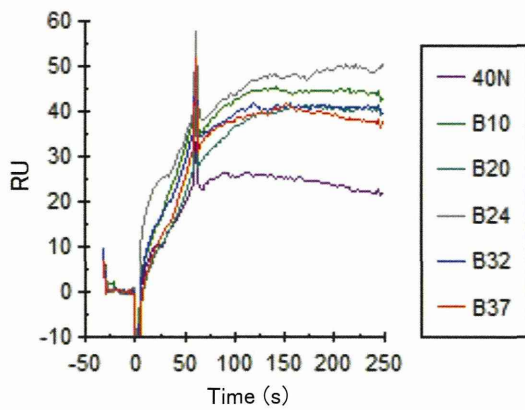


図8. SPR法によるRNAアプタマー候補とBMP2の相互作用解析

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する資料①

一覧表

(別添5)

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
中岡竜介, 齋島由二, 新見伸吾	医療機器・材料の 国際標準化動向	バイオマテリアル -生体材料	33(1)	56-63	2015
Koide M, Ohkuma K, Ogura H, Miyagawa Y	A new method for fabricating zirconia copings using a Nd:YVO4	Dental Materials Journal	33	422-429	2014
Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, 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	102B	721-728	2014
Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S	Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing.	J. Biomed. Mater. Res. Part B	102B	1809-1816	2014

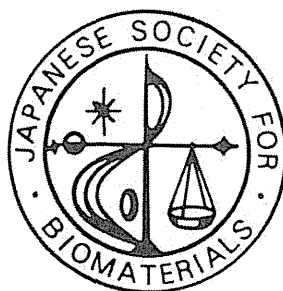
<p>薮島由二</p>	<p>第1部：医療機器市場の拡大と新規製品の開発：開発，上市化，市場確保において留意すべきポイント</p>	<p>生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略（監修：田中 賢）. サイエンス&テクノロジー</p>		<p>3-21</p>	<p>2014</p>
<p>Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A, Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung U, Ogawa K, Niimi S, Yoshida M</p>	<p>Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers.</p>	<p>J. Vinyl Add. Technol.</p>	<p>in press</p>		<p>2015</p>

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する資料②

バイオマテリアル-生体材料, 33(1):56-63 (2015)

バイオマテリアル -生体材料-

Journal of Japanese Society for Biomaterials



Vol. 33
2015. JANUARY No.

1

Offprint

Title

Name

Department

Institution

Address

Postal Code

City

Country

Phone

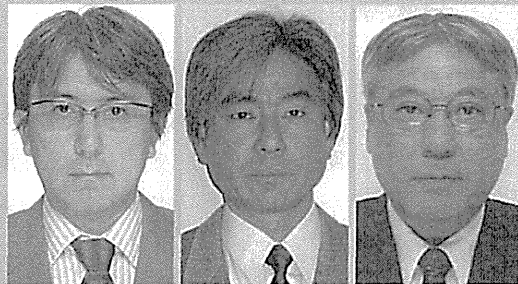
Fax

JJSB

日本バイオマテリアル学会

**Journal of Japanese Society
for Biomaterials**

医療機器・材料の国際標準化動向



中岡竜介^{a)}, 薮島由二^{a)}, 新見伸吾^{a)*}
(写真左), (中央), (右)

JJSB

Current activities on international standardization of medical devices and their materials

Globalization of economic activities makes their national boundary indistinct so that it becomes very probable that many products without harmonization with their international standards cannot distribute in a worldwide. Even in a field of medical devices, which is controlled by regulatory authority in each country, international standardization of medical devices and their materials by ISO and/or IEC becomes important for industries as well as the regulatory authorities more than before.

In this article, we introduce current domestic and international activities of the standardization of medical devices and their materials. In addition, outlines of important ISO standards related to medical devices, which are developed by two ISO technical committees, are introduced as well.

近年、グローバル化に伴う経済活動の国際的な障壁低下が進んでいるため、さまざまな分野において国際標準と整合性の取れない製品は世界市場に受け入れられなくなってきている。各国において規制対象である医療機器においてもその傾向は見られており、企業のみならず規制当局も国際標準を作成するISO、IECの活動を無視することは出来なくなっている。

ここでは、筆者らが関わっている医療機器・材料に関連した国際標準化の現状を述べるとともに、重要と考えられる国際標準を紹介する。

Ryusuke Nakaoka^{a)}, Yuji Haishima^{a)}, Singo Niimi^{a)*}
Key words: 医療機器, 国際標準化, ISO, 規制

「バイオマテリアル」誌の読者の多くには耳慣れない言葉かもしれないが、国際標準化とは、ある特定の事柄(技術、製品、試験法、システム等)を国際的に共通化するための取り決めであり、簡単にいえば国際的に共通な“ものさし”を作成することといてよい。従来は、国際市場での競争を勝ち抜いて実質的な国際標準となるケース(デファクト規格: WindowsやBlu-ray等)が多かったが、現在は、国際標準化機構(ISO)や国際電気標準会議(IEC)のよう

な国際的な機関内での討議を経て、特定の事柄に関する国際標準化が行われることが主流となっている。

さまざまな分野における国際標準化の促進が、現在、国策としても取り上げられてきているが、近年のグローバル化の高まりに伴い国際市場におけるサービスや製品の流通におけるその重要性は増大する一方である。医療機器業界も例外ではないが、他の製品群とは異なり、その製造販売は世界各国において“規制”対象であることから、国際標準化の影響はその流通や品質のみに留まらない。

医療機器・材料の国際標準化は、産業界のみに留まらず、官・学を含んだ医療機器に関わるすべてのステークホルダーに影響を及ぼすものであることを本稿を通じて理解していただければ幸いである。

国際標準化の現状

グローバル化は、その活動拡大の妨げとなっていた国境の壁を引き下げることで市場を世界

^{a)} Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
【略歴】(中岡竜介) 1994年 京都大学大学院工学研究科博士後期課程単位取得認定退学(1996年博士(工学))、1994年 ヒューマンサイエンス財団流動研究員、1996年 国立医薬品食品衛生研究所(当時: 国立衛生試験所)医療機器部(当時: 薬品部)研究員、2008年 同医療機器部第四室長、2009年 同医療機器部埋植医療機器評価室長、現在に至る。専門: 医用高分子、再生医学。趣味: サッカー、音楽
【略歴】(薮島由二) 1989年 城西大学大学院薬学研究科博士後期課程修了(薬学博士)、1989年 旧西ドイツ/ホルステル研究所研究員、1990年 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部研究員、1997年 同医療機器部第一室長、現在に至る。専門: 化学、微生物学、分子生物学。趣味: 卓球
【略歴】(新見伸吾) 1984年 徳島大学大学院医学系研究科博士課程修了(医学博士)、1984年 徳島大学医学部酵素病理学教室助手、1984年 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員、1997年 同生物薬品部診断用医薬品室長、2002年 同生物薬品部第二室長、2003年 同生物薬品部第三室長、2013年 同医療機器部長、現在に至る。専門: 医療機器の安全性、バイオ医薬品の品質及び免疫原性。趣味: 音楽鑑賞

単一化してきている。単一市場では、性能の如何にかかわらず、そこで標準化された共通規格、すなわち国際標準が重要視され、それから解離した仕様の製品は受け入れられなくなる。この観点から、現在の世界市場では、従来の「よい製品が勝ち残り市場を制する」状況から「規格(標準)を制したものが市場を制する」状況に変化してきている。製品に共通となるプラットフォーム技術(標準)に自社技術を提供することは、知的財産権の面からみると不利になる可能性も孕むが、その後、独自技術を加えることで他社との差別化を図ることが容易になる。すなわち、特定の技術を国際標準化しておくことにより、将来自社製品が市場を勝ち抜く土俵を予め作り出す戦略が可能になるのである。従来の日本のものづくり方針は「よい製品を市場に送り出して競争に勝ち市場を制する」傾向がより強かったことから、その方針が現在の世界動向に合わなくなってきているのは明確である。このような状況を作り出している原因はいくつか考えられるが、その一つとして企業経営陣を含め各業界の方向性を決定しうる関係者の多くに国際標準化の重要性が普及していない点あげられる。欧米諸国は、元来ボーダーレスな市場を模索していたこともあり、古くから国際標準化を重視していたが、近年は中国、韓国、ブラジル等の国々に加えて、独自路線をとっていた米国も国際標準化を利用した市場拡大のため、ISOやIEC等における国際標準化活動へ積極的に参画しはじめている。

標準化は製品における性能面での差別化を困難にし、市場にたんなるコスト競争を引き起こす危険性を孕んでいるものの、事業戦略を明確にしたうえでそのために必要な標準は作成し、不要な標準は排除する戦略的な取り組みにより市場および利益の確保が可能となる。すなわち、製品仕様の決定にあたり、競争領域と協調領域をどのように線引きすれば市場を勝ち抜くことができるのかを手助けする手段として標準化が利用できる。留意すべき点は、標準化が技術の固定化、硬直化を引き起こし、将来の技術革新における障壁となる可能性があることである。このような標準は、作成しても将来使用されなくなり結果的に市場から排除されることになるため、市場競争においては不利益なものになってしまう。この

ように、現在、標準化は企業において市場競争を勝ち抜くための開発戦略と密接に関わっているため、対象とする製品の開発状況、製品と関連した知的財産権の状況および市場ニーズに加えて、品質管理等、製品に関連するその他の事項の標準化状況を鑑みた事業戦略が必須となっている。このような流れは医療機器産業においても同様であるが、規制という観点からみた場合、他の産業と異なり、わが国の医療機器産業が国際市場で勝ち残っていくためには産・官・学がより一体となった標準化戦略が必要となる。

医療機器規制と国際標準化

医療において、医療機器は医薬品とならぶ重要な医療製品である。医療機器が実際に臨床で使用されるようになるためには、適切なレベルの性能、安全性、品質が保証される必要があるとともに、その製造販売には各国における許認可が必須となる。わが国においては、医療機器のリスクに応じて国際的な枠組みに沿った分類がなされ、その分類に応じた規制が適用されている。現在、リスクの低い医療機器に関しては、届出や認証制度が利用されているが、リスクの高い新しい医療機器は原則として(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)による承認審査において、リスク&ベネフィット評価の概念に基づいて、その製造販売の可否が判断される。これら許認可においては、医療機器共通(ホリゾンタル)の標準やその品目に固有の標準が利用されている。

米国もわが国と同様の規制を行っているが、欧州においては、現在、医療機器指令に基づき、欧州標準(EN)を利用した自己、あるいは第三者認証機関により医療機器の製造販売が判断されている。

近年、粗悪な品質の人工乳房が欧州で販売されていたこと等が問題になったため、指令ではなく規制(regulation)で医療機器の製造販売を規制する制度が導入される予定だが、ENを利用した医療機器の製造販売判断制度の大枠に基本的な変化はないものと思われる。1991年に欧州標準化委員会(CEN)とISOとがウーン協定を締結したことに伴い、現在、医療機器分野の標準においてもEN=ISOとなる状況が生まれている。その結果、欧州市場におけるISO

の地位が向上していることから、世界市場を視野に入れた米国企業および政府は、従来の自国標準 (American Society for Testing and Materials, ASTM 等) 重視の姿勢から ISO 重視の方向に舵を切ってきている。事実、医療機器に関連する ISO の委員会において、FDA 関係者が議長を務めているケースが年々増えている。原則、議長は中立性を求められるが、現実的には公平性を保ちつつも少なくとも自国にとって不利な状況をつくり出さないような議論の舵取りが可能であるため、米国規制当局が ISO の有効活用を見据えて活動していることは明らかである。

(注：国際標準は IS (International Standards) と略されることもあるが、文書の頭には作成された機関名 (ISO や IEC) が記されることから標準自体を ISO, IEC と記すことが多い。その慣例に従って、本稿では標準そのものも ISO, IEC と記すことにするので、読者らは混乱されないよう留意されたい)。

わが国においても、古くは WTO/TBT 協定を踏まえた標準・認証制度の国際整合化を促進する一環として、ISO と国内標準である JIS (Japan Industrial Standards) との整合化が求められるようになった。また、政府調達は国際標準に適合するよう義務づけられたことから、国際標準化の重要性は高まる一方であった。

近年では、平成 26 年に閣議決定された「健康・医療戦略」¹⁾ における健康・医療に関する国際展開の促進が施策としてあげられ、医療分野、特に医薬品、医療機器等の審査において利用可能な国際標準化の策定、提案等の推進が明記された。これまで、医療機器の認証基準や各種ガイドライン等に引用規格として適宜 ISO や IEC は用いられてきたところであるが、今後はたんなる引用に留まらず、わが国の技術を医療機器関連の国際規格とし、日本発医療機器を国際的に展開するための戦略とそのための環境構築が推進されることになる。

このように、標準が国内外の規制に幅広く利用されることを考慮した場合、世界的にみても、開発者側である産・学と規制側である官との間の医療機器評価における基準の共有化が進むことが期待される。一方、標準の骨子、基準や適用方法は客観的かつ科学的に妥当なものであると同時に、原則として国際

的に許容可能なものでなければならない。国際標準を利用する医療機器産業関係者が開発研究・事業を活性化させるためには、実際の標準化作業を知ることが非常に重要となるので、以下に ISO における標準化活動例を紹介する。

医療機器に関連した国際標準化活動例

現在、ISO において医療機器関連の国際標準化作業を行っている技術委員会 (Technical Committee, TC) は 14 であり、そのうち TC 194, 198 および 210 では医療機器全般に適用可能な水平的な標準を主に作成している (表 1)。これら以外にも“表面化学分析”を扱う TC 201 のように医療機器の評価と関連する可能性がある TC が複数存在するため、それらの TC を含めるとその数はさらに増える。また、IEC では TC 62 およびその下部機関である分科委員会 (Sub Committee, SC) において医用電気機器に関して共通適用される標準 (通則) や個別の医用電気機器に関する標準を作成している。本稿では筆者らが活動に関係し、かつ本誌「バイオマテリアル」誌の読者にも関連する二つの TC を取り上げ、それらの活動状況を紹介する。

なお、標準作成は Web システムを介した作業が中心となっており、新規標準化提案 (technical specification および technical report 等を含む) からはじまり、その採択可否投票、投票国からのコメント送付、提案者 (国) によるコメント対応作業および改訂案回覧に至る一連の工程を繰り返して進められる。これら作業の詳細と標準化文書の種類に関しては、日本工業標準調査会 (JISC) のホームページ²⁾ に国際標準化の概要とともに詳細な説明があるので参考にされたい。

国際標準化は、素案の採択可否を含めその過程において行われる数回の投票段階毎に一定以上の同意を得る必要があることから、往々にして重要な案件は上記作業では収束しない。そのため、直接議論を交わして、ある程度の合意段階にまで標準案をまとめあげることができる総会での討議が重要な役割を担ってきた。総会は、最低、年 1 回程度開催されているが、近年は Web 会議による討議も多く行われて

表1 ISOにおける医療機器関連の技術委員会(TC)

TC	Title	SC数	議長(国籍)	事務局	日本の参加状況
45	Rubber and rubber products (ゴムおよび製品)	4	Malaysia	Malaysia	P-member
76	Transfusion, infusion and injection, and blood processing equipment for medical and pharmaceutical use (医療用輸血装置)	0	Germany	Germany	P-member
84	Devices for administration of medicinal products and catheters (医療用注射器および注射針)	0	USA	Denmark	P-member
106	Dentistry (歯科)	8	Canada	Canada	P-member
121	Anaesthetic and respiratory equipment (麻酔装置及び人工呼吸器関連装置)	6	USA	USA	P-member
150	Implants for surgery (外科用インプラント)	7	USA	Germany	P-member
157	Non-systemic contraceptives and STI barrier prophylactics (避妊具)	0	Malaysia	Malaysia	P-member
170	Surgical instruments (外科用器具)	0	Vacant	Germany	O-member
172	Optics and photonics (光学およびフォトニクス)	7	Germany	Germany	P-member
194	Biological and clinical evaluation of medical devices (医療機器の生物学的および臨床評価)	1	Germany	Germany	P-member
198	Sterilization of health care products (ヘルスケア製品の滅菌)	0	UK	USA	P-member
210	Quality management and corresponding general aspects for medical devices (医療機器の品質管理と関連する一般事項)	0	USA	UK	P-member
212	Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems (臨床検査及び体外診断システム)	0	USA	USA	P-member
215	Health informatics (保健医療情報)	0	USA	USA	P-member

P-member: Participating member. O-member: Observing member (投票権なし)

TC: Technical Committee. SC: Sub Committee

おり、関係者との直接議論の機会は増加している。

1. TC150 "Implants for surgery" (外科用インプラント)

1971年に設立されたTCであり、その名の通り外科用インプラントに関連する国際標準を作成している。事務局はドイツ標準局が担当しており、議長はFDAに所属するMr. John Goodeが務めている。日本は、各種投票に参加できるP-member(participating member)としてこのTCに参加している。委員会に参加する場合、国内における窓口を担当し、国内での意見を集約するための業務を行う団体(国内審議団体)が必要となっており、TC 150では日本ファインセラミックス協会と日本医療機器テクノロジー協会(MT JAPAN)がその責務を担っている。国内委員会には、筆者らを含め複数名のバイオマテリアル学会会員が委員として参加している。

このTCは、標準化作業を促進するために、TC直下に作業グループを形成する以外に、標準化対象を具体的に分担して扱うためのSCを七つ設立している(表2)。なお、親TCへの活動報告義務はある

が、SCは設立時に定められた業務範囲に関する標準作成を親TCから独立して行うことができる。そのため、設立時の業務範囲がその時代のトピックスと一致しないこと等が原因で、同じTCに属していてもSC間で活動の活発さに差が生じる。実際、SC 3は作業対象となる案件が存在しないため現在休眠中であるが、その他のSCおよび各作業グループ(WG)は活発な作業を行っている。

このTCにおける議論対象は、外科用インプラントに使用される材料(金属、高分子、セラミックス)に関する標準や、具体的な個別製品(人工関節、人工骨等)に必要な要件に関する標準、材料や個別製品を対象にした具体的な試験法(強度試験、疲労試験)に関する標準等をこれまでに141作成してきている。これまでにTC 150で作成された標準のタイトルを分野毎に分けていくつか以下に示す。

【材料・製品標準例】

- ISO 5832-4:2014 Implants for surgery—Metallic materials—Part 4: Cobalt-chromium-molybdenum casting alloy