

り、既に DIS (Draft International Standard) 投票を 2 回終え、オーストラリアとドイツから、非常に多くのコメントが寄せられていることが確認された。しかしながら、投票国全てが賛成票を投じていたことから、その標準化文書発行のための条件は満たされていること、2015 年中に当該文書が発行される可能性があることが判明した。

TC 276 では「医療産業は業務範囲から除外する」ことになっているものの、WG 4 “Bioprocessing” で、日本の再生医療イノベーションフォーラム (FIRM) を中心に再生医療等製品も含めたバイオテクノロジー製品の製造プロセスに関連した標準化を目指した作業を進めていることが明らかとなった。また、WG 1 では、各国で定義されているバイオテクノロジー関連用語を収集・整理した「辞書」の作成に取りかかっているが、その用語対象の中に、再生医療等製品に関連するものが含まれていることが判明した。

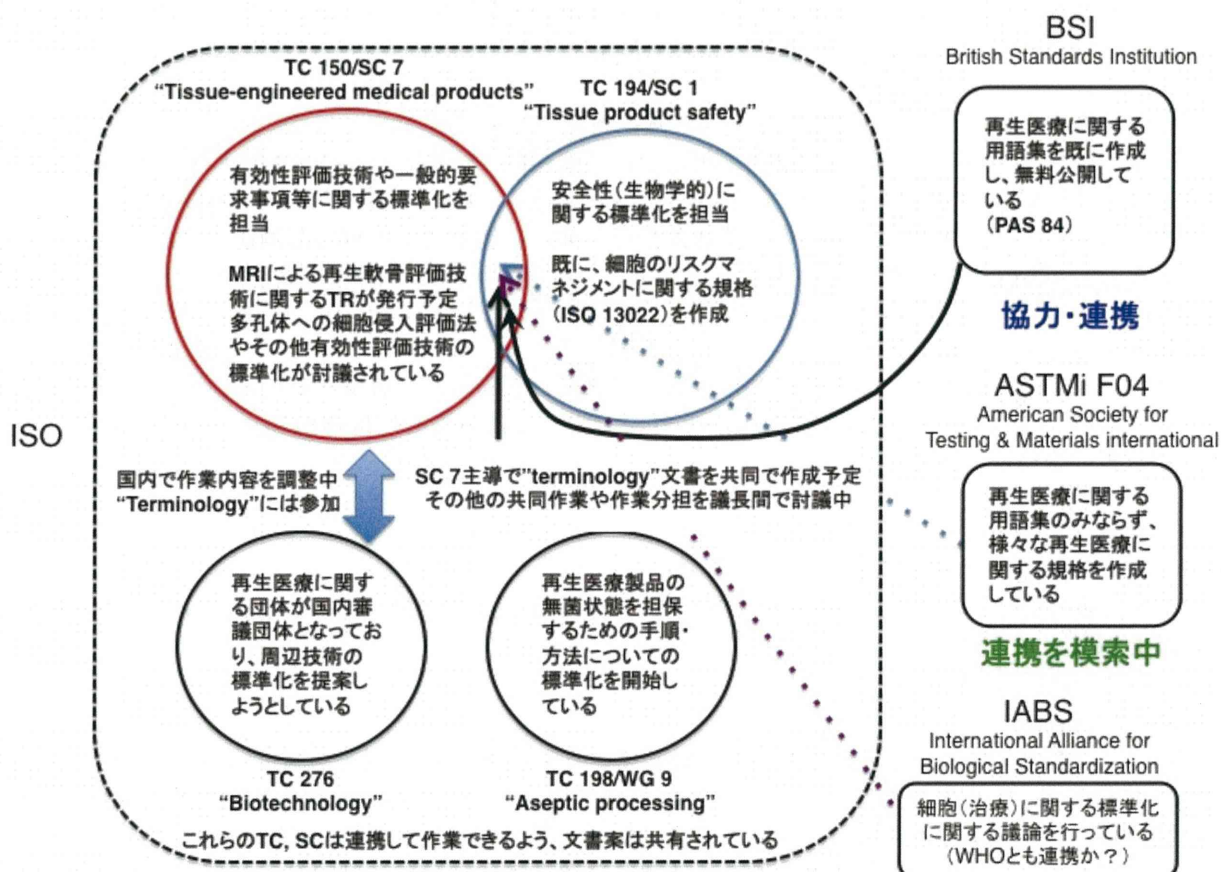


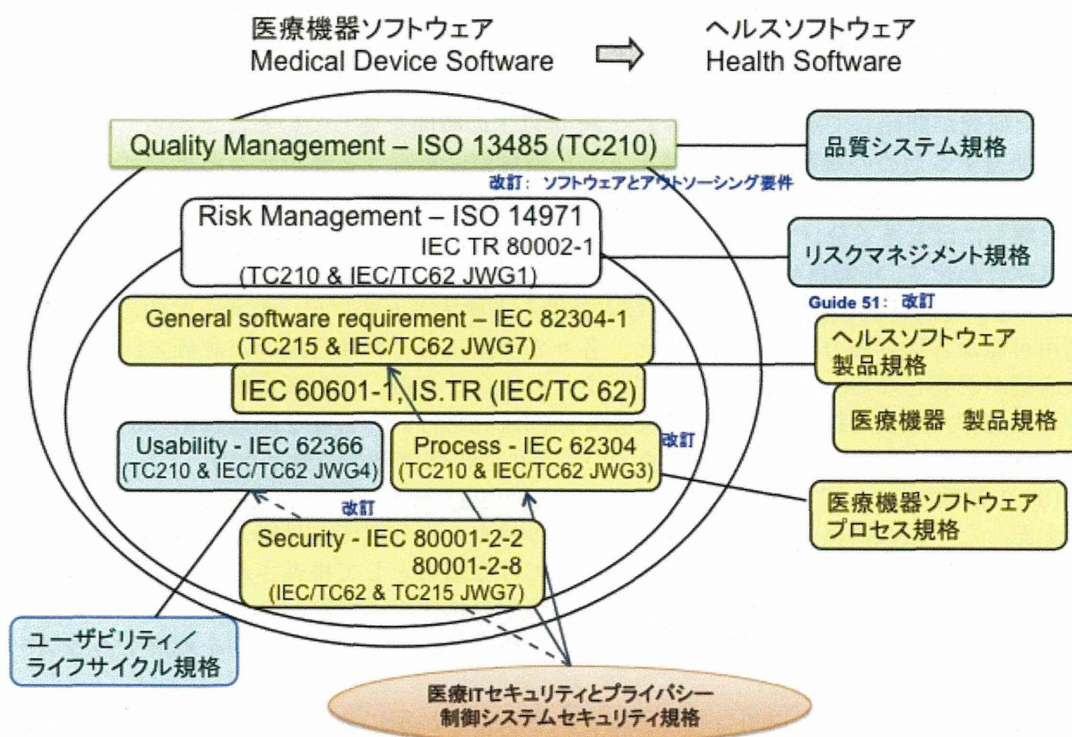
図 1. 再生医療等製品関連の国際標準化状況

「医療機器ソフトウェア」

「医療機器ソフトウェア」に関しては、医療機器とソフトウェアとの異なる視点を統合して標準化を行わなければならないため、非常に複雑な状況となっていることが、初年度には明らかとなっている。その中で、最も重要且つ影響度の大きい「医療機器の品質管理 (QMS)」に関する国際規格 (ISO 13485) の改訂作業が ISO/TC 210 で進んでいるが、その改訂は医療機器全般に影響を及ぼすため予定よりも時間を要しており、2015 年中に二度目の DIS 投票を行うべく再改訂案 (2nd DIS) の作成が行われている。この規格では参照文書としてソフトウェアの製品及びプロセス規格が明記されることになり、医療機器ソフトウェアが QMS の対象となりうること、それ以外に、図 2 に示したように、非常に多くのソフトウェア関連規格が QMS に取り込まれることになっている。

また、QMSに引用される各種規格はIEC単独ではなく、ソフトウェア関連のIEC/TCとISO/TCとの合同ワーキンググループ(joint WG)で作成されていること、医療機器関連の規格となるにも拘わらず、ISO側からは医療情報を中心に扱っており、情報系の専門家が多数参加しているTC 215が関わっているケースが多いこと、TC 215が参加するJWG 7において、本来、Software for Medical Deviceにおける設計・開発(ライフサイクル)プロセスのための規格であったIEC 62304をHealth software全般を対象にした改訂版(第2版)作成が開始されたこと等が明らかとなった。

医療機器ソフトウェアの参照国際規格の状況



IEC/TC 62 Software and Networks Advisory Group (SNAG)国内支援委員会 資料より(一部改変)

図2. 医療機器ソフトウェア関連の国際標準化状況

(2) 国際標準化に対する医療機器関連企業の意識調査及び啓蒙活動

初年度、医療機器業界団体を介して企業の国際標準化に対する意識を確認するためのアンケート調査を行い、得られた回答から企業の国際標準化に関する理解、姿勢等の現状について確認された主な事項を以下に示す。

- ・ 「デジュール」標準が主流となっていることは理解している
- ・ 海外において国際標準化への取り組みが活発化していることは把握している
- ・ 実際に、国際標準化に関わっている企業は少数である可能性が明らかとなった
- ・ 上記企業においても、その取り組み度合いに大きな温度差があること、多くの企業で国際標準化に携わる人材への補助等を行っていないこと等が明らかとなった
- ・ 国際標準化に取り組んでいない企業が挙げるその理由の多くが人材不足であった

アンケートの結果から、企業からの国際標準化活動参加を活発化させて国際市場における日本企業の優位性を確保するためには、企業上層部の理解は不可欠であることが改めて明らかとなった。よって、これを解決する一つ的手段として、国、具体的には経済産業省、厚生労働省や関係機関による企業上層部への啓蒙活動が考えられた。このことを受けて、法人や学会等で医療機器業界関係者や国際標準化に

取り組んでいる関係者を対象に、初年度には講演会を開催、2年度には学会等における発表・講演を4回行い、医療機器における国際標準化の現状報告とその重要性の啓蒙を行った。また、本事業を紹介する総説・解説を医療機器関連の学会誌に寄稿した。

E. 考 察

国内外において上市されている再生医療等製品は数えるほどであり、且つ海外展開を行っている企業は存在しない（なお、欧州医薬局の審査により製造販売承認を得た ChondroCelect は EU 内の複数国で使用が認められているが、これは一般的な「海外展開」とは異なると判断した）。米国においても自家培養表皮、自家培養軟骨が 1997 年に製造販売承認を得てから、新規の製品として実用化に至った例は数える程である。我が国では、J-TEC が 2007 年に自家培養表皮、2012 年に自家培養軟骨の製造販売承認を取得したが、それ以外の製品は未だ上市されていない。培養表皮に関する研究が 1970 年代に開始されたことを鑑みると、我が国におけるその実用化には約 30 年を要したことになる。また、軟骨に関しても、実用化に繋がった研究が開始してから承認取得まで 20 年以上の時間を要していることから、再生医療等製品の実用化を加速するための規制や標準化等を含んだ環境整備を行う必要があると思われる。そのためには、まず、「再生医療等製品」の特性を理解し、その種類を明確にしておく必要がある。

「再生医療」には大きく分けて 2 つのジャンルが存在する。一つが、細胞と人工物 (Scaffold)、増殖因子等を組み合わせて、組織再生を試みる「組織工学」、もう一方が細胞のみを用いて組織再生を行う「細胞治療」である。それぞれの品質、安全性及び有効性を考慮するためには、両者を明確に区別した上で、両者に適用可能な各種評価方法の開発に加え、各々の製造工程や特性を鑑みた評価方法の開発と評価システムの構築が必要となる。これらを進めていくためには、今後、再生医療研究に携わっている全てのジャンルの研究者が垣根を越えて密に情報交換や共同研究を行い、必要な関連技術の開発や規制への取り組み、さらにはそれらの国際標準化を進めていくための組織構築が必要となる。

現在、ISO の複数の TC、SC で再生医療の stakeholder らが集まり国際規格の作成を進めているという事実は、上記した「組織構築」の重要性を理解しつつ将来の海外展開を見据えた戦略を準備している国や企業があることを示唆している。現在、我が国における国策として推進されている健康・医療戦略において、医療分野における規制に利用可能な国際標準化の作成推進が掲げられていることを鑑みると、今後、関連学会同士の密な連携の構築等、何らかの対策を講じて上述した問題を解決する方法を模索していく必要がある。

作成された国際規格が実際に規制当局に利用されるか否かは別に議論しなければならないが、再生医療の実用化促進も上記戦略に挙げられていることから、我が国はこの分野で主導権を握っていく必要がある。そのためには stakeholder 間で情報及び認識を共有しつつ、上述した問題を解決し、戦略的且つ統一的に再生医療等製品の国際標準化に取り組んでいかなければならないことが明確となった。また、そのために、限られた human resource の有効活用、ISO/TC における標準化業務の集約化が重要課題であることが考えられた。

現在、我々は、再生医療等製品と関連した標準化作業を行っている TC 150/SC 7、TC 194/SC 1、TC 198、TC 276 国内委員会関係者及び関係省庁関係者との間で、再生医療等製品に関する国際標準化に関して統一した方向性と連動性を共有するための連携体制構築に、非公式ながら取り組み始めている。この活動が、今後の再生医療等製品関連の国際標準作成を戦略的な All JAPAN 体制で行うための土台となることを、我々は期待している。

医療機器ソフトウェアの標準化も、現在、米国が主導権を握ってその作成を行っていることが示される調査結果を得た。しかしながら、医療機器としての標準化にも関わらず、ISO 側では主に情報系専門家で形成される TC 215 が関わっており、医療機器の特性を考慮しない規格が作成されるのではないかとの点が医療機器業界で危惧されていることが判明した。そのため、TC 215、あるいは joint WG に医療機器業界からメンバーを送り込んでいる実態が明らかとなった。

ISO 13485 の改訂に伴い医療機器ソフトウェアが QMS の対象となりうること、その際の引用規格が多くなることから医療機器ソフトウェアの製造工程管理が非常に複雑化する可能性が示唆された。しかしながら、ISO 13485 の改訂は、その作業が予定よりも遅れて進んでいることが明らかとなった。この遅れは、親規格である ISO 9001 の改訂版が 2015 年中に発行される可能性があること等、様々な懸念が存在しているためである。今後の改訂作業によっては、最終的に発行される改訂版における「医療機器ソフトウェア」関連の内容も改訂される可能性も存在する。

国内では、医薬品医療機器等法が施行されたことに伴い、QMS 省令も修正され現行の ISO 13485 との整合性が高められたばかりである。よって、ISO 13485 の改正が成立した場合、国内における QMS 省令の国際整合を再考慮しなければならない可能性がある。よって、医療機器ソフトウェアのみならず、医療機器分野全体の課題として ISO 13485 の改訂状況を注視していかなければならない。

医薬品医療機器等法の施行に先立って、医療機器の基本要件基準も改正され、将来、医療機器ソフトウェアに関する国際標準を何らかの形で規制に取り込むことが示唆されている。よって、現在改訂中の IEC 62304 を中心とした医療機器ソフトウェア関連国際規格も規制において重要になることは明らかであり、我が国も産官学共同でこれらの規格作成に積極的に関与しなければならない状況になっていることが示唆されている。

初年度、実施したアンケート結果で、医療機器企業関係者への啓蒙活動が必要であることが明らかとなったことから、医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙する目的で、講演会を 1 回、発表・講演を 4 回行った。行った講演は、それぞれ研究センター、学会、標準化関連団体、ISO 活動支援団体が主催したものであり、それぞれ国際標準化に関する興味の度合いは異なるものの、講演後の質疑で多数の質問が出たことから、その重要性を啓蒙することができたと思われる。

企業内にも潜在的には国際標準化の重要性を感じている方々が多いことがアンケート結果から示唆されていたことから、企業を対象とした講演を実施できなかった面で啓蒙活動は十分ではなかったと思われる。よって、医療機器産業界を対象に同様の取り組みを行い、関係者、特に、企業上層部に直接国際標準化の必要性を訴えていく等の活動を実施することが、今後の課題である。

F. 結 論

「再生医療等製品」と「医療機器ソフトウェア」にテーマを絞り込み、現在行われている国際標準化活動状況を取りまとめた。その結果、前者では製品開発に先行して「デジュール」規格の作成が始まっており、複数の ISO/TC で関連技術の国際標準化作成作業が活発化していること、後者においてはその標準化が QMS をも巻き込み複雑化しているが、その鍵となる ISO 13485 の改訂が滞っていることが明らかとなった。前者においては、我が国が主導権を握れる分野であり、製品の實用化に先立って「デジュール」規格作成が活発化していることから、製品カテゴリーの明確化や A11 JAPAN 体制を構築し戦略的な活動を実施しなければならないことが明らかになった。後者においては、ソフトウェアを内包する医療機器も含め、その規制が厳しくなる可能性があることも示唆されたが、鍵となる ISO 13485 の改訂が遅れていること、それに伴いその内容に変更が生じる可能性が示唆された。ISO 13485 の改訂は、我が国における QMS 省令へも影響を及ぼす可能性があること、ソフトウェア関連国際標準をどのように規制に取り入れていくかを検討している段階であることから、今後、我が国も積極的にその作成に関与していかなければならないことが示唆された。

医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙する目的で、国際標準化に対する企業の意識調査をアンケートにより実施した。その結果、国際標準化に積極的な企業はあまり多くないことが明らかとなった。また、国際標準化に積極的に参画している企業であっても、目に見える形で担当者を評価している企業は少なく、担当者のモチベーション低下が危惧された。これらのことから、医療機器分野の国際標準化活発化のためには、国を挙げてのサポートだけではなく、企業上層部の意識改革を目的とした啓蒙活動を行う必要が示唆された。そこで、医療機器業界関係者及び団体等を対象に講演会を 1 回、研究発表、講演を 6 回、学会誌への寄稿（総説 2 報）を行った。その結果、医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙することができた。

G. 健康危険情報

特になし。

H. 研究発表

- 1) 中岡竜介. ISO/TC 150/SC 7 の現状と課題. セラミックス, 48(10):819-823 (2013).
- 2) 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).
- 3) Nakaoka R. Activities of standardization for tissue-engineered medical products in International Organization for Standardization (ISO), Termis-AP 2013 Annual Conference,

Wuzhen, China (2013.10).

- 4) 中岡竜介. 再生医療分野における国際標準化の現状とその展望について. 第13回日本再生医療学会総会 (2014年3月・京都)
- 5) 中岡竜介、齋島由二、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)
- 6) 中岡竜介. 医療機器に関連した国際標準化状況について: ISO/TC 150 (外科用インプラント) を中心に. 「ISO/TC 150 (外科用インプラント) とバイオセラミックスの国際標準化の状況」講演会 (2015年1月・東京)
- 7) 中岡竜介. 国際幹事経験談及び医療機器分野国際標準化の現状について. 平成26年度第2回ISO国際標準化研修 ― 上級編 (実践コース) (2015年1月・東京)

参照資料: 特になし

Ⅱ．総合分担研究報告書②

歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究

大熊一夫

日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科理工学講座

総合分担研究報告書

平成 25, 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

歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究

研究分担者 大熊 一夫 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科理工学講座

研究協力者 藪島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
蛭原 善則 株式会社ジーシー
Somchai Urapepon マヒドン大学 (タイ)

A. 研究要旨

本研究では、「国際標準化機構 (ISO) 及び国際電気標準会議 (IEC) における医療器機の各種国際規格の策定に関する研究 (H23-地球規模-指定-003)」において策定した「医療機器規格・基準の国際標準化戦略に係る政策的提言」を具体的に実行する一環として、新規規格の提案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ため、歯科分野におけるケーススタディを実施した。

歯科界で注目されている医療器機である歯科用 CAD/CAM に関する規格を ISO/TC106/SC9 に日本から新規提案し、CD 化に至るまでの情報を収集した。本規格は、平成 25 年度 ISO/TC106 総会 (インチョン会議) における新規提案を経て、平成 26 年 6 月に CD 案「Machining accuracy of computer-aided milling machines -Test methods」の投票が行われ、賛成 9 カ国及び反対 3 カ国の結果をもって採択された。同年 9 月に開催された ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議では、Convener として、5 カ国によるインターラボラトリーテストの結果報告及び各国から提出されたコメントに対応した。また、本 CD に新たな CMM 及びソフトウェアを追加することが提案され、2nd CD ヘステージを進めた。

B. 研究目的

従来、歯科分野において使用される殆どの修復物の材質は金属であった。これに変わる優良な修復材料がセラミックスであり、ジルコニアセラミックスが開発された。ジルコニアセラミックスをコア材として用い、従来のセラミックスの強度を補強したセラミック修復物であるオールセラミッククラウンを作製するのに不可欠な機械が CAD/CAM である。歯科用 CAD/CAM は、1985 年にスイス・チューリッヒ大学のグループが、シーメンス社と共同で開発して世に送り出した CEREC システムが世界初であった。日本国内では、通産省/NEDO (新エネルギー・産業技術総合開発機構) 傘下のプロジェクトが開設される等、世界的にも、歯科界においても最も注目されているのが歯科用 CAD/CAM である。国内に眼を向けても、平成 26 年 4 月に、コンポジットレジン冠として CAD/CAM が歯科診療報酬に採択された。近未来に歯科界のリーダーシップを獲得するため、平成 24 年度に開催された ISO/TC106/SC9 パリ会議において、日本からの新提案規格である「ISO/CD 18845 Machining accuracy of computer-aided milling machine -Test methods」の概要を説明した。平成 25 年度のインチョン会議を Ad-hoc 5 として開催し、平成 26 年度のベルリン会議を SC9/WG5 として開催した。ベルリン会議では各国から提出された CD に対するコメントに回答し、標準化を目指して活動した。

本研究では、新規規格の提案を通じて国際標準化に必要な戦略を収集するため、歯科分野におけるケーススタディとして、日本からの新規提案規格である「Machining accuracy of computer-aided milling machine -Test methods」の国際標準化を目指して活動した (この規格のタイトルは CD 化に至る過程において変更された)。

C. 研究方法

(1) インターラボラトリーテスト

平成 25 年度 ISO/TC106/WG5 会議（インチョン会議）において、タイと日本で実施した新規規格に準じて行った実験結果を報告し、実現可能な規格であることを報告した。そこで、CAD/CAM で作製したセラミック修復物の精度の評価方法の理解や改善のため、米国、タイ、ドイツ、スウェーデン及び日本の 5 カ国でインターラボラトリーテストを行うことになった。新規規格に記載した寸法の 1 級インレー用、2 級インレー用、クラウン用及びブリッジ用金型から三次元データを取得し、切削用三次元データに変換し、半焼結ジルコニアセラミックブロックから CAD/ CAM マシンを用いて修復物を作製した。作製した修復物を金型に装着し、金型と修復物の変位量を測定し、修復物の精度の評価を行った。

(2) 測定のための印記

インチョン会議において、1 級インレー及びクラウンのような上面像が正対称の修復物の場合、測定を行う上で試料に印記する必要性が話題となった。そこで、最初の測定点を 0° とし、修復物と金型との変位量を測定した。同様に、 45° 、 90° 、 135° 、 180° 、 225° 、 270° 、 315° 毎に試料を回転させ、計 8 点における修復物と金型との変位量を測定した。

(3) CAD/CAM 材料の被切削面

一定加工条件下における 4 種類の修復物材料（ジルコニア未焼結、ジルコニア本焼結、コンポジットレジン及び純チタン）の被切削表面の画像を取得し、加工痕を評価した。通常、表面粗さの評価には表面粗さ計を用いるが、国際標準としての利用価値を高めるため、容易にデータを取得できる画像による解析法を採用した。ジルコニア未焼結の加工は Dry 条件下、加工ピッチ 0.1mm、仕上げ代 0.1mm、ジルコニア用ダイヤモンド、送り速度 500mm/min、工具回転数 2500min^{-1} で行い、ジルコニア本焼結、コンポジットレジン及びチタンにおいても同一の加工条件で切削した。加工状態は被切削面を観察することにより評価した。

(4) ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議

平成 25 年インチョン会議では暫定 Convener であったが、平成 26 年ベルリン会議には Convener として出席し、CD 投票時に各国から寄せられたコメントに対して回答する等、会議を円滑に運営した。

D. 研究結果

(1) インターラボラトリーテスト

インターラボラトリーテストには米国、タイ、ドイツ、スウェーデン及び日本の 5 カ国が参加したが、ベルリン会議までに作業が完了し、結果の報告に至った国はタイと日本のみであった。タイのクラウンと金型の変位量の測定結果は、ジルコニアセラミックスで平均 $+0.08\text{mm}$ 、コンポジットレジンで $+0.50\text{mm}$ 、ワックスで $+0.08\text{mm}$ であった。日本のジルコニアセラミックスで作製した精度は $+0.005\text{mm}$ であった。この差は変位量の測定機器の限界によるものである。加工精度は、被切削材料に影響されるが、日本から提案した方法により評価できることが確認された。

(2) 測定のための印記

I 級インレーと金型との変位量の平均は $+0.962\text{mm}$ であり、クラウンの場合は $+0.422\text{mm}$ となった。I 級インレーとクラウンの標準偏差は、それぞれ 0.074 及び 0.024 であり、変位量平均値の 1/10 程度の小さい値であった。また、測定回数（この場合角度が大きくなる）が多くなるほど、修復物と金型の変位量が減少する傾向が認められた。これらの成績から、測定のための印記は必要性ないことが確認された。

(3) CAD/CAM 材料の被切削面

同一加工条件下におけるジルコニア未焼結とジルコニア本焼結の被切削面を比較すると、ジルコニア本焼結の被切削面の中心部に十字用の大きな工具による痕が残ると共に、切削加工中に工具が破損する等、適正な加工条件でないことが判明した。一方、ジルコニア未焼結は切削工具の痕が認められず、適正な被切削面であることが確認された。同様に、コンポジットレジンも適正な被切削面、純チタンは不適正な被切削面であることが確認され、被切削面から適切な切削加工条件を評価できることが判明した。

(4) ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議

6月にCDの投票が始まり、8月にCD投票が締め切られた。その結果、賛成9カ国、反対3カ国（オーストラリア、ブラジル及びスウェーデン）、棄権2カ国をもって、本CDは採択された。

反対票を投じたオーストラリアとスウェーデンは本CDが「加工機の精度に特定した評価法」であることを理解しておらず、「システム全体」の評価法として誤認している可能性が考えられたため、事前の国内委員会において、「序文及び適用範囲」を修正した。国際会議にあたり、本修正版を事前に各国エキスパートへ回付した。

ベルリン会議は各国から寄せられたコメントに対する回答で始まった。会議中、概ね日本の提案については合意が得られたが、日本提案の金型を用いた測定方法でなく、CMM (Coordinate Measuring Machine: 三次元測定機)及び三次元の元データとCAD/CAMで作製したセラミック修復物の三次元データの変位量の差を求めるソフトウェア法が米国から提案された。この結果、これらの項目を追加した2nd CDにステージアップすることになった。

D. 考 察

平成22年に開催されたISO/TC106（リオデジャネイロ会議）におけるロビー活動の一環として、前Convener（故小倉英夫）がドイツ及び米国の代表者に歯科用CAD/CAMの必要性及び重要性について説明し、各国から内諾を得た。翌平成23年に開催されたPlenary（フェニックス会議）において、新SC（ISO/TC106/SC9: CAD/CAM systems）の設立を日本が提案した。平成24年に新しいSCが開設され、昨年从高橋英和（東京医科歯科大学）がこのSC9の暫定議長を務め、今年から6年間の任期でSC9の議長に任命された。また、平成24年に開催されたISO/TC106（パリ会議）において、日本から提案した新たな規格である「Accuracy evaluation of machined dental restorations using CAD/CAM」の概要を説明した。日本から医療機器・技術・手法の新規提案を行う場合、内容や原文も重要であるが、それ以前のロビー活動が成功のための大きな因子であることを再確認した。

ISO/TC106国際会議の進行は、投票の結果報告、各国からのコメントの回答の流れになる。TC106の場合、各国からのコメントに対する回答は、会議において初めて報告される事例が多い。しかし、今回はスムーズに会議を進行させると共に、日本からの提案に対する承認を得るため、コメントに従って内容を修正した規格案を会議前に各国エキスパートに会議資料として事前に回付した。また、米国代表団長が議事録作成等を引き受けるに至るまでの信頼関係を築けたことも、会議がスムーズに進んだ要因である。ベルリン会議では、日本が提案した金型を用いる精度の測定方法のほか、CMM及び三次元データの变位量を求めるソフトウェアを利用する方法が米国から提案されたため、これらの項目を追加した2nd CDへステージを進めることになった。

インターラボラトリーテストにも、大きな変化が生じてきた。以前ならば、インターラボラトリーテストに参加表明した場合、全員（国）が結果を提出した。今回の場合、インターラボラトリーテストに参加表明したのは5カ国であったが、金型を日本から提供したにもかかわらず、実験結果を提出したのは2カ国（タイ及び日本）のみだった。タイの積極的な協力を得られた要因としては、実験担当者が個人的な知人であったことが挙げられる。一方、スウェーデンの様に測定を実施せず、代案を提出することなく、規格案に反対する国も存在するが、国際標準化を成功させるためには、このようなハードルも越えていかななくてはならない。

最近では、ISO事務局における作業の遅延が多いことから、作業早期進捗（3年ルール）を公式な報告書に明示した。具体的には、1)投票結果が会議直前に判明し、資料の準備が不十分な状態でWG会議を行うケース、2)投票結果の発表が会議に間に合わず、投票結果が未判明の状態でWG会議を行うケース、3)新たな提案を行う際、討議のベースとなる文書が準備されていないケース等、ISO事務局から幾つか指導されている。これを受けて、WGレベルでの事前審議が活発化されることが予想される。今後、討議の場はWG会議のみに留まらず、e-Committeeを活用して文書を電子メールにて回付し、期限付きで各国エキスパートにコメントを求める等、迅速に作業を進める環境が急速に整備されることが容易に予測されるため、国内の審議態勢を整えることが急務である。

日本から提案した医療技術を国際標準化するには、WGのConvenerを獲得することが一つの近道である。国際会議においては、様々な企業、研究者及び各国の規制当局が多種多様な意見を発信するが、Convenerはこれらの意見を取りまとめ、最終決定を下す権限を持っていることがその理由である。Convenerを獲

得する方法として、1)卓越したアイディアのもとに新しいWGを設立する、2)Convenerの交代時期に相応の担当者を育成しておくことが挙げられる。国際標準化に関与する人材、特にConvenerを養成するためには5-10年の歳月を要する。そのためには、政府、大学及び企業の多大な助成が必要であり、国家的なサポート体制を構築することが重要である。

F. 結 論

インターラボラトリーテストの結果、CAD/CAMにより作成されたセラミック修復物の加工精度は、日本が提案したCD「Machining accuracy of computer-aided milling machine -Test methods」により正しく評価できることが確認された。また、ベルリン会議（平成26年9月）における討議の結果、本提案規格にCMMとソフトウェアを追加して2nd CDステージに進めることとした。

国際会議では、会議前の丁寧な説明及び会議資料の提供により、各国からの信頼を得ることが重要である。また、日本から提案した医療技術を国際標準化する一つの道は、WGのConvenerを獲得することである。

G. 健康危険情報

特になし。

H. 研究発表

- 1)Kameda T, Ohkuma K, Oda H, Sano N, Batbayar N, Terashima Y. Magnetic fields from electric toothbrushes promote corrosion in orthodontic stainless steel appliances but not in titanium appliances. *Dent Mater J*, 33:959-969 (2013).
- 2)Kameda T, Ohkuma K, Sano N, Terada K. Electric current induced in teeth by electromagnetic fields from electric toothbrushes and curing lights. *Orthod Waves*, 72:77-85 (2013).
- 3)Kameda T, Ohkuma K, Sano N, Shin Y, Terada K. Modification of metallic materials for a white appearance without coating and plating. *Orthod Waves*, 72:87-98 (2013).
- 4)Kameda T, Ohkuma K. Electromagnetic fields from dental devices and their effects on human health. *J Electr Electron Syst*, 3:118 (2014).
- 5)小出未来, 大熊一夫, 蛭原善則, 三吉 愛, 小倉英夫. Nd:YVO₄レーザーを用いたジルコニアコーピングの新しい加工法—プログラム修正した時の加工精度—. 第61回春期日本歯科理工学会学術講演会 (2013年4月・東京).
- 6)小出未来, 大熊一夫, 蛭原善則, 小倉英夫. Nd:YVO₄レーザーを用いたジルコニア焼結体からコーピングを直接製作する方法. 日本補綴歯科学会設立80周年記念第122回学術大会 (2013年5月・福岡).
- 7)亀田 剛, 織田洋武, 大熊一夫, 佐野奈都貴, 寺嶋縁里, 佐藤 聡, 寺田員人. 電動歯ブラシが発生する低周波磁界はマルチブラケット装置内に電流を誘導し, 装置を腐食させる. 第72回日本矯正歯科学会 (2013年10月・松本).
- 8)小出未来, 大熊一夫, 小倉英夫, 宮川行男. Nd:YVO₄ナノ秒レーザーを用いたジルコニアコーピングの新しい加工法. 第62回秋期日本歯科理工学会学術講演会 (2013年10月・新潟).
- 9)小出未来, 大熊一夫, 小倉英夫, 宮川行男. Nd:YVO₄レーザーを用いたジルコニアコーピングの新しい加工法—被照射面の熱処理後のラマン分光分析—. 日本歯科理工学会第63回春季学術講演会 (2014年4月・千葉).
- 10)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).
- 11)赫多 清, 大熊一夫, 宮川行男. 陶材の咬合摩耗に及ぼす試験片支持材料の影響. 第64回秋期日本歯科理工学会学術講演会 (2014年10月・広島).

参照資料

- 1)第49回ISO/TC106インチョン会議報告書. 2013年(通巻34号), 日本歯科材料器械研究協議会, 2014.
- 2)第50回ISO/TC106ベルリン会議報告書. 2014年(通巻35号), 日本歯科材料器械研究協議会, 2015.

Ⅱ．総合分担研究報告書③

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

薮島由二

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

総合分担研究報告書

平成 25, 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 齧島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

協力研究者

野村祐介	国立医薬品食品衛生研究所	金 玲	株式会社リボミック
福井千恵	国立医薬品食品衛生研究所	山崎佳世	民生科学協会
小園 知	国立医薬品食品衛生研究所	熊田秀文	神奈川歯科大学
河上強志	国立医薬品食品衛生研究所	浜田信城	神奈川歯科大学
伊佐間和郎	国立医薬品食品衛生研究所	藤澤彩乃	東京大学
吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所	鄭 雄一	東京大学
井上 薫	国立医薬品食品衛生研究所	柚場俊康	川澄化学工業株式会社
森川朋美	国立医薬品食品衛生研究所	坂口圭介	テルモ株式会社
市村亮平	国立医薬品食品衛生研究所	谷川隆洋	テルモ株式会社
前田 潤	国立医薬品食品衛生研究所	杉山知子	テルモ株式会社
高橋美和	国立医薬品食品衛生研究所	犬飼香織	テルモ株式会社
小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所	竹ノ内美香	テルモ株式会社
中村義一	株式会社リボミック	新藤智子	食品薬品安全センター
宮川 伸	株式会社リボミック		

A. 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3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ラウンドロビンテストを支援し、我が国の試験法を ISO10993-4 に取り込むように努力するため、処方を改良した溶血性試験用陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シートを新たに作製し、その基本性能を検証した後、ラウンドロビン試験用標準品として提供した。本陽性対照材料の性能は良好であり、今後、ISO/TC194/WG12 に国際標準品として新規提案する予定である。

材料開発分野におけるケーススタディでは、ISO/TC194/WG11 における代替可塑剤の安全性評価に関する規格作成に対応するため、我が国が開発を進めている新規血液バッグの代替可塑剤である DOTP のラット亜慢性毒性試験を実施した。その結果、DOTP はいずれの臓器に対しても顕著な影響を与えず、その無毒性量は 300 mg/kg body weight/day 以上と判定された。また、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においては、蛋白質間相互作用解析及び細胞内シグナル伝達解析により、生理活性を保持した状態で bFGF を補足する3種の RNA アプタマー (1p01、1p02 及び 2p03) を選定したと共に、材料表面への固定化法を最適化した。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。

B. 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いて3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）を支援した。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、パイロット試験、ミニ試験を経て、総計13施設（海外11施設、国内2施設）が参画した本試験が完了した。

材料開発分野におけるケーススタディとしては、代替可塑剤の安全性評価に関する研究を実施した。現在、ISO/TC194/WG11では、PVC製医療機器の製造に利用される代表的な可塑剤であるDEHPの毒性、化学分析法及び耐用摂取用量を取りまとめたISO/PDTS 29741: Biological evaluation of medical devices - Development of tolerable intake values for Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)文書の改訂作業を行っている。その一方、DEHPの使用についてはリスク回避の観点から欧州を中心に規制が強化される方向にあり、特にフランスでは2015年からDEHPの使用が禁止される。日本の医療機器分野においてもリスク患者群の治療にあたっては代替機器又は代替可塑剤を利用した製品への切り替えが推奨されている。このような背景のもと、諸外国では安全性に優れた代替可塑剤を利用したPVC製品の開発研究が活発に進められているため、PDTS 29741文書の改訂作業が完了次第、代替可塑剤の安全性に関する議論がISO/TC194/WG11において開始されることが容易に予測される。そこで、我が国が開発を進めている新規血液バッグの代替可塑剤であるDOTHの安全性評価を通じて代替可塑剤に関する国際規格の作成に寄与することを目的として、同可塑剤のラット亜慢性毒性試験を実施した。

材料開発分野においては、RNAアプタマーを利用した革新的医用材料の開発研究も実施した。生体内に埋植される医用材料は材料表面に吸着する蛋白質層を介して細胞と相互作用するため、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。それ故、成長因子や抗体等を固定化し、特定の機能を付与した材料表面も開発されているが、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、その生理活性を阻害する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アプタマー候補を選定する際に、その生理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。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捕捉し、その機能を制御できる可能性が非常に高い。そこで本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を特異的に捕捉するRNAアプタマーを選定すると共に、その機能を解析し、同アプタマーを固定化した材料表面上で細胞培養を行うことにより、RNAアプタマー材料の機能を評価した。

C. 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、ESB0 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0.4mm）は同パウダーを利用してヒートプレス法（180℃）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（直接接触及び抽出液法）：3時間、NIH法（直接接触法）：1時間、MHLW法（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 1120331A・114002A、テルモ/承認番号 120163・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：代替可塑剤の安全性評価/DOTHのラット亜慢性毒性試験

2-1. 動物実験及び病理解析

飼化した5週齢のSD系雄ラット（8匹/群）にDEHP（5000 ppm）及び種々の量のDOTH（0, 5, 50, 500, 5000 ppm）を13週間混餌投与した。イソフルラン麻酔下、BD社製バキュティナ採血管（16 mm SST採血管血清分離剤入）に断頭採血し、放血殺後の動物を用いて、全身諸臓器の詳細な病理肉眼的検査を実施した。脳、胸腺、心臓、脾臓、肝臓、副腎（両側）、腎臓（両側）、精巣（片側）、精巣上体（片側）及び前立腺副葉については重量測定を行い、絶対及び体重値に対する相対重量を算出した。

病理肉眼的検査後、精巣（片側）及び眼球（両側）を除く以下の臓器を10%中性緩衝ホルマリン液により固定した。精巣はブアン液、眼球はダビットソン液を用いて固定した。固定後の各臓器は、切り出し後、常法に従って脱水、パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施して、光学顕微鏡にて病理組織学的検索を行った。

2-2. 精子数測定

ラット右精巣上体を採取後、PBS（4.5 mL）中で細切し、37%ホルマリンを0.5 mL加えて固定化した。同溶液10 µLに20 µM Hoechst 33258含有PBS（90 µL）を添加し、室温下15分間放置して細胞核を蛍光染色した後、キーエンス社製BZ-9000を利用して細胞数を計測した（測定波長：Ex 360 nm/Em 460 nm）。

2-3. ホルモン測定

採取血液を室温下30分間放置後、遠心分離して調製した血清を試料として、テストステロン、エストラジオールE2、卵胞刺激ホルモン（FSH）甲状腺ホルモン（TSH）をELISAにより定量した。テストステロン、FSH及びTSHはEndocrine Technologies社製キット、エストラジオールE2はEnzo Life Sciences社製キットを利用して測定した。

2-3. 倫理面への配慮

国立医薬品食品衛生研究所が規定する動物実験に関する指針に従い、動物に対する苦痛が最小となるよう務めた。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（承認番号434）。

(3) 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

3-1. bFGF 捕捉型 RNA アプタマー材料開発

3-1-1. RNA アプタマー/bFGF/FGFR1 三者複合体形成能の評価

すでに得られているbFGFに特異的に結合するRNA配列の中から、10種のRNAアプタマー候補（1p01, 1p02, 1p03, 1p07, 1p41, 2p03, 2p04, 2p05, 2p10, 2p11）を選定し、合成した。また、陽性対照として、bFGFと結合し、その生理活性を阻害するbFGF Aptamer (bFA)と、結合活性の無いランダム配列である40Nも同様に合成した。RNA合成においては、3'末端に16 ntのPoly Aが付加されるようにデザインした。RNAアプタマー/bFGF/FGFR1三者複合体形成能は、BIAcore 2000を用いた表面プラズモン共鳴法（SPR）によって評価した。センサーチップとしては、ストレプトアビジン固定化チップ（SAチップ）を

用いた。同チップに 5'末端ビオチン標識 Poly dT (pdT) を結合させた後、リガンドとなる RNA の 3'末端に存在する Poly A と pdT の塩基対形成により SA チップに候補アプタマーを固定化した。本 SA チップを利用して、RNA アプタマー候補と bFGF との結合能を評価した後、FGFR1 を添加して三者複合体形成能を評価した。

3-1-2. bFGF の生理活性に及ぼす RNA アプタマーの影響評価

BIAcore 解析において、bFGF との複合体形成能を有することが認められた候補アプタマーと bFGF を添加した培地を利用して、マウス線維芽細胞 (NIH3T3) を培養した。刺激開始から 30 分後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法により FRS2 及び ERK のリン酸化状況を観察した。抗体としては、P-FRS2 及び P-ERK に対する特異的抗体を利用した。

3-1-3. RNA アプタマー固定化材料の機能評価

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。同材料上でヒト間葉系幹細胞 (hMSC) 及び NIH3T3 を培養した。培地は DMEM 及び MSCGM、血清は 5%ヒト血清 (HS) 及びウシ胎児血清 (FBS) を用いた。染色には Hoechst 33258 を用い、BZ-9000 を用いて核数を計測することで細胞増殖能を評価した。

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 に対する RNA アプタマーの選定は SELEX 法によって行なった。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 を取り込める変異体酵素を用い、転写反応を行なった。SELEX は各種金属イオン (Ca, Mg, Na 及び K イオン) を共存させた条件で行ない、得られた配列のシーケ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し、各グループの配列に対して、プログラム Mfold 及び RNAfold を用いて二次構造解析を行ない、BMP2 結合に必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 SPR によって評価した。EMSA では二価のイオンの有無の違いによる影響を調査するために、泳動用緩衝液は Mg イオン存在下及び非存在下の 2 条件で行なった。SPR による相互作用解析では、BIAcore3000 を用い、bFGF のケースと同様に SA チップ及びビオチン標識した pdT を用いて評価した。

D. 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テスト支援

1-1. Genapol X-080 含有 PVC シートの性能評価

Genapol X-080 含量の異なる 3 種の PVC シートを作製し、その溶血誘導能を評価した結果、直接接触法を利用した ASTM 法及び NIH 法では、Genapol X-080 添加量に比例して溶血率が増加した。抽出液法を利用した場合、1.5 及び 10 パーツ添加標品は ASTM 法及び MHLW 法ともに完全溶血を惹起したが、1.0 パーツ添加標品の溶血率はそれぞれ 86.8%及び 49.9%であり、1.5 及び 10 パーツ添加標品と比較して溶血性が低いことが確認された。

1-2. 溶血性試験国際ラウンドロビンテスト

パイロット試験及びミニ試験を経て、平成 26 年度に本試験を実施した。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 2 施設が行った試験結果を示す。

1-2-1. 陰性対照及び強陽性対照の試験結果

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/抽出液法ともに、ほぼ 100%の溶血率を示した。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。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。

1-2-2. 弱陽性対照材料の試験結果

LGの溶血特性を最も感度良く検出できる試験法はNIH/直接接種法であり、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。

BRの溶血特性はASTM/直接接種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。

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、直接接種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/直接接種法と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。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：代替可塑剤の安全性評価/DOTHのラット亜慢性毒性試験

2-1. 体重及び摂餌量の変動

投与期間中の発育状況は全群ともに良好であり、体重推移及び摂餌量については各実験群間に有意差が認められなかった。なお、DOTH 5000 ppm投与群のDOTH平均摂取量は300 mg/kg body weight/dayであった。

2-2. 臓器重量

DOTH投与群は、対照群（DOTH 0 ppm）と比較して、全群ともに各臓器の絶対重量及び相対重量に有意な変動を示さなかった。DEHP投与群では、いずれの臓器も絶対重量に有意差は認められなかったが、相対重量において、肝臓では18%、腎臓では14%程度の軽度な増加が観察された。

2-3. 病理肉眼的検査

投与による病理肉眼所見はいずれの臓器ともに認められなかったが、脂肪肝を示す個体が対照群を含むいずれの群においても散見された。

2-4. 病理組織学検査

病理組織学的検査において、DEHP投与群の肝臓に軽度なびまん性肝細胞肥大が8例中7例認められた。この肝細胞肥大は統計学的に有意な増加であった。また、肝細胞肥大を示す肝細胞は、やや顆粒状で好酸性を呈していた。対照群（DOTH 0 ppm）及びDOTH 5000 ppm投与群においては異常が認められなかった。

DOTH 5000 ppm投与群の精巣については、いずれの個体ともに正常な精子形成像が認められ、精子形成ステージの構成細胞にも投与による異常は認められなかった。精巣上体については、精巣上体管腔内に細胞残差が散見される個体が観察された。DEHP群では3例であったが、対照群においても2例認められた。また、変化の程度は、いずれも管内に数個以下と軽度であった。この細胞残差は正常でも1個程度は認められた。

相対重量で有意な増加が認められた腎臓については、皮質及び髄質いずれの部位においても投与による変化は認められなかった。その他、比較的発生頻度の高かった病理組織学的変化として、小葉周辺性の肝細胞脂肪化、肝臓のマクロファージやリンパ球を主とする単核球浸潤、前立腺のびまん性/限局性リ

ンパ球浸潤、限局性心筋炎がいずれの群にも認められた。しかし、いずれも対照群と同程度の発生であり有意差は認められなかった。

2-5. 精子数及びホルモン変動

右精巣上体中に存在する精子数を計測した結果、個体毎のばらつきが大きく、各実験群間に有意差は認められなかった。また、血清中に存在するテストステロン、エストラジオール E2、FSH 及び TSH 量を ELISA により定量した結果、実験群を問わず、いずれのホルモンともに大きな変動は観察されなかった。

(3) 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

3-1. bFGF 捕捉型 RNA アプタマー材料開発

3-1-1. RNA アプタマー/bFGF/FGFR1 三者複合体形成能の評価

BIAcore を用いて bFA 及び RNA アプタマー候補と bFGF との相互作用を解析した結果、bFA 及び RNA アプタマー候補の全てが bFGF に結合することが確認された。さらに FGFR1 を添加して三者複合体形成状況を検討した結果、bFA では FGFR1 添加による RU 値の影響は観察されなかったが、RNA アプタマー候補では FGFR1 添加により、RU 値の低下が観測された。

3-1-2. bFGF の生理活性に及ぼす RNA アプタマーの影響評価

BIAcore を利用した bFGF/FGFR1 結合能解析結果に基づいて、bFA、40N、1p01、1p02、1p07、2p03、2p05 及び 2p11 の bFGF 細胞刺激阻害能の評価を行なった。その結果、bFA、1p07、2p05 及び 2p11 では P-FRS2 抗体と P-ERK 抗体を用いたウエスタンブロットによりバンドが確認されなかったが、40N、1p01、1p02 及び 2p03 では FRS2 と ERK のリン酸化体が検出された。これらの結果から、1p01、1p02 及び 2p03 は、bFGF の生理活性を保った状態で bFGF を補足する RNA アプタマーであることが判明した。

3-1-3. RNA アプタマー固定化材料の機能評価

生理活性を損なうことなく bFGF を補足する RNA アプタマー 1p01 及び陰性対照の 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 NIH3T3 並びに hMSC とともに、1p01 コートした材料表面上で細胞数が多く観測された。また、5% FBS/DMEM 培地条件下で hMSC を培養した場合には同様に 1p01 コート材料の方が pdT コート材料よりも細胞数が多く観測されたが、同細胞を 5% FBS/MSCGM 培地で培養した場合には 1p01 コート材料及び pdT コート材料ともに、ほぼ同じ細胞数であった。

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 クローンの配列解析を行ない、それらについて ClustalW を用いたグルーピング解析を行なった結果、5 種類の配列に収束していることが明らかとなった。これら 5 種類の配列 (B10、B20、B24、B32 及び B37) についてプログラム Mfold 及び RNAfold を用い、二次構造解析を行なった結果、それぞれが異なっ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 種類の配列と BMP2 の結合能について、EMSA により評価した結果、二価のイオンが存在していない条件下では、BMP2 が加わると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 において、明瞭な複合体のバンドが確認できた。また、SPR による解析の結果では、すべての RNA アプタマー候補が同程度で BMP2 に結合することが確認された。

E. 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 2 : 代替可塑剤の安全性評価/DOTH のラット亜慢性毒性試験

SD 系雄ラットを用いて DOTH 及び DEHP を 13 週間混餌投与した結果、投与による影響は、肝臓における相対重量の増加、びまん性の肝細胞肥大として DEHP 群にのみ観察された。DOTH 投与群には同様の変化は認められなかった。同変化は、肝細胞が顆粒状/好酸性でびまん性に肥大していると共に、DEHP が PPAR α 作用を有することが明らかになっていることから、Peroxisome の増加に起因することが示唆された。小葉周辺性の肝細胞脂肪化は、本試験において使用した SD 系ラットの雄で体重増加及び加齢により増加する変化である。対照群及び DOTH 群のみに認められた脂肪化は、通常の 13 週間反復投与毒性試験の背景値と比較して若干進行していると考えられた。肝細胞脂肪化は、高脂肪食や高カロリー摂取で観察されることから、この脂肪化は飼料に起因する可能性が示唆された。また、DEHP 群では脂肪化が殆ど認められなかったが、これは上記のとおり、投与による肝肥大が誘発されているためと考えられた。

本試験では、DEHP 及び DOTH 投与群ともに、精巣における病理組織学的変化は観察されなかった。精巣上体管腔は、軽度な精子形成異常や精細管変性が生じた場合、変性した精上皮細胞が腔内に増加することから、精巣毒性を検出する鋭敏な部位とされているが、今回いずれの投与群においても精巣上体に精巣への影響を示唆する所見は認められなかった。これらの結果から、今回の投与条件下では、DOTH 及び DEHP ともに精巣への影響は認められないと結論した。我が国において定められた DEHP の経口摂取 TDI 値は 40-140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であり、その上限値と下限値はそれぞれ Poon ら及び Lamb らの報告に基づいて決定された。本研究は Poon らの報告に準拠して実施したが、DEHP が精巣/生殖毒性を発現する用量は報告毎に異なっているため、今後実施する代替可塑剤の毒性試験においては、Lamb らの報告に従って投与量を設定する。

その他の各臓器に認められた病理組織学的変化については、対照群と同程度であり有意差は認められなかったことから、投与に関連した増加とは考えられなかった。肝細胞脂肪は肉眼的な脂肪肝に対応する変化と考えられた。

(3) 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 bFGF 及び BMP2 を補足する 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 に結合する RNA アプタマー候補と bFGF、FGFR1 との相互作用を BIAcore により解析した結果、RNA アプタマー/bFGF 複合体形成が観測された。同複合体に FGFR1 を添加した際、bFA/bFGF の場合では RU 値に変化が観測されなかったことから、同複合体に FGFR1 が結合できないことが確認された。これは、bFGF の FGFR1 結合部位に bFA が強く結合するため、FGFR1 が結合できないことに由来すると思われる。一方、RNA アプタマー候補と bFGF の複合体の場合では、FGFR1 添加に伴い RU 値が低下したことから、bFGF/FGFR1 複合体が優位に形成され、bFGF が RNA アプタマーから解離したことを示唆している。本来の目的として、RNA アプタマー固定化材料表面に捕捉された bFGF が、細胞膜上に存在する FGFR1 と結合した後に RNA アプタマーから解離した場合でも、bFGF シグナル伝達が正常に稼働する環境であれば機能性材料としての性能は確保される。NIH3T3 細胞に対する bFGF の細胞刺激阻害試験を行なった結果、1p01、1p02 及び 2p03 は bFGF の生理活性を阻害しないことが確認された。この結果は BIAcore 解析において得られた成績とも一致していることから、この 3 種類の RNA アプタマーの中から 1p01 を選定し、機能性材料の開発を進めた。RNA アプタマー-1p01 及び陰性対照の pdT を材料表面上に固定化し、同材料上で細胞培養を行なった。その結果、ほぼ全ての条件下で陰性対照である pdT に比べて、1p01 コート材料は細胞増殖促進効果を有することが認められ、意図した機能を発揮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進めると共に、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行ない、RNA アプタマー材料の有効性及び安全性を評価することにより、革新的医用材料として提案するための検証データを収集する。

BMP2 に対する RNA アプタマーを用いた材料開発のため、SELEX 法により、BMP2 に結合する RNA アプタマー候補を選定した。得られた RNA について配列解析を行なった結果、アプタマー候補は 5 種類の配列に収束しており、それら RNA アプタマー候補の二次構造上に共通の構造モチーフが保持されていないことから、それぞれが特有の構造を形成していることが示唆された。これらの RNA アプタマー候補と BMP2 の相互作用を EMSA によって評価した結果、B10 及び B24 は Mg^{2+} イオン存在下において明瞭な複合体のバンドが見られたことから、この 2 つの RNA と BMP2 と結合については Mg^{2+} イオンが重要な役割を果たしていることが明らかである。ヒト IgG に対する RNA アプタマーにおいては複合体形成に Mg^{2+} もしくは Ca^{2+} イオンが必要であることから、B10 及び B24 の RNA アプタマー候補においても、 Mg^{2+} イオンが BMP2 との複合体形成に必要であることが示唆された。一方、SPR による相互作用解析では、いずれの RNA アプタマー候補ともにランダム配列よりも強い結合を示した。本研究における SPR 及び SELEX の条件下では、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 及び Na^{+} イオンが共存するため、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持つ可能性が示唆された。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共通の構造モチーフが見られず、相互作用解析での挙動が同じではないことから、それぞれが異なった機構で BMP2 と結合していると考えられた。今後、5 種類全ての RNA を用いて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 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。

F. 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 : 代替可塑剤の安全性評価/DOTH のラット亜慢性毒性試験

代替可塑剤の安全性を評価する一環として、SD 系雄ラットを用いて DOTH 及び DEHP を 13 週間混餌投与した結果、投与による影響は、DEHP 投与群の肝臓にのみ観察された。DOTH については、いずれの臓器においても投与による影響は認められず、その無毒性量は 300 mg/kg body weight/day 以上と判定された。

(3) 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

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。

G. 健康危険情報

特になし。

H. 研究発表

- 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, 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, 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) 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).
 - 7) 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).
 - 8) 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).
 - 9) 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. 新規血液バッグ素材 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).
 - 10) 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).
 - 11) 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, 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).
 - 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, 靛島由二. 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) 特願 2013-104082 (平成25年5月16日)「血液バッグ」. 発明者:靛島由二, 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.