

FIGURE 3 Hemolytic behavior of MAP/RCC containing plasticizers at the concentration of 1 µg/mL (a, b) or 100 µg/mL (c, d). *Significant difference ($p < 0.05$) was detected between the control and plasticizers, such as DEHP, DIDP, DOTP, and DINCH, effective in suppressing hemolysis at the concentration of 100 µg/mL (c), but not among these four plasticizers. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

incubation. The hemolytic behavior of MAP/RCC in the presence of the PVC sheet containing TOTM (50.5%) was almost identical, and the ratio reached 28.2% after incubation [Figure 4(a)]. The PVC sheets spiked with DEHP (33.7 w/w%), DINCH (24.5–50.5 w/w%), or DOTP (24.5–50.5 w/w%) considerably decreased the hemolytic ratio to 10.9%, 9.2–12.4%, and 5.2–7.8%, respectively [Figure 4(a–c)]. The degree of hemolysis suppression effect of the PVC sheets containing DINCH or DOTP was not greatly influenced by the difference in the plasticizer content. Although DIDP itself had the ability to suppress hemolysis of MAP/RCC, the PVC sheet containing DIDP (24.5–50.5 w/w%) did not exhibit a significant hemolysis suppression effect, irrespective of the amounts spiked [Figure 4(d)].

Plasticizer elution test

The elution of the plasticizers from the PVC sheets containing DEHP, TOTM, DINCH, DIDP, or DOTP was determined to evaluate the relationship between the degree of the hemolysis suppression effect against MAP/RCC and the amount of plasticizer released from each PVC sheet. These plasticizers were quantified by GC-MS/MS analysis by using DEHP-*d*₈ as the internal standard. The LOD, LOQ, and recovery values are listed in Table I.

As shown in Table II, the amount of DEHP released from the PVC sheet spiked with DEHP (33.7 w/w%) increased in

a time-dependent manner and reached 53.1 ± 6.07 µg/mL after 10-week incubation in MAP/RCC. The amount of plasticizer eluted from the PVC sheet containing TOTM (50.5%) was significantly low, corresponding to only 0.27 ± 0.09 µg/mL even after the 10 week incubation. The amount of plasticizer eluted from the PVC sheet spiked with DOTP (24.5, 35.7, 44.0, and 50.5 w/w%) increased in a time- and dose-dependent manner. The amount was approximately 2–3 times greater than that of DEHP and reached 78.4 ± 13.7 , 117 ± 8.0 , 143 ± 16.8 , and 150 ± 26.0 µg/mL, respectively, after 10 weeks of incubation. The amounts of DINCH and DIDP released from the PVC sheets containing each plasticizer (24.5, 35.7, 44.0, and 50.5 w/w%) also increased in a time-dependent manner and reached 26.1–36.5 and 4.80–5.96 µg/mL, respectively. However, a significant difference was not clearly detected in the amount of elution in response to the plasticizer content. The degree of elution of DIDP was ~10 times lower than that of DEHP, irrespective of the amounts spiked. The amount of elution of DINCH was also lower than that of DEHP.

DISCUSSION

This screening study investigated alternative plasticizers exhibiting a hemolysis suppression effect against RBCs and evaluated the relationship between the degree of the suppression effect and the amount of the plasticizer eluted

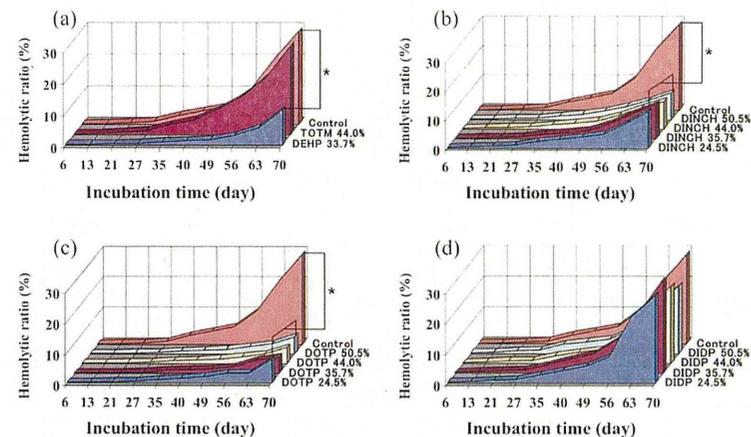


FIGURE 4 Hemolytic behavior of MAP/RCC in the presence of PVC sheets spiked with several plasticizers. (a) No plasticizer (control); DEHP (33.7 w/w%); and TOTM (44.0 w/w%). (b) DINCH (24.5, 35.7, 44.0, and 50.5 w/w%). (c) DOTP (24.5, 35.7, 44.0, and 50.5 w/w%). (d) DIDP (24.5, 35.7, 44.0, and 50.5 w/w%). *Significant difference ($p < 0.01$) was detected between the control and DEHP (a), and control and DINCH (b) or DOTP (c), while there was no significant difference between the control and DIDP. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

from the PVC sheet. The chemical structures of the plasticizers used in this study are shown in Figure 1. The results of the hemolysis test, in which 8 kinds of plasticizers structurally categorized into five groups were used, suggested that the presence of 2 carboxy-ester groups at the *ortho* position on a 6-membered ring of carbon atoms may be needed for the plasticizer to exhibit the effect. DEHP, DIDP, DINCH, and DOTP, all of which have the ability to suppress the hemolysis of MAP/RCC, have such a structure. TOTM possesses this basic structure as a part of the molecule, but its 6-membered ring is substituted by an additional carboxy-ester group, and this might be the reason why TOTM seems to be ineffective in suppressing hemolysis. The same basic structure is not present in DEHTP, DEHA, and ATBC, which did not exhibit any hemolysis suppression effect on MAP/RCC. The structure of the 6-membered ring does not seem to be restricted to aromatic compounds because the suppression effect is also seen in the case of partially unsaturated or saturated rings. The mechanism underlying hemolysis suppression by DEHP, DINCH, DIDP, and DOTP is unknown, but it could be speculated that these plasticizers may be incorporated into and stabilize the lipid bilayer of the RBC membrane, because there is a possibility that plasticizer molecules having the two carboxy-ester groups oriented to the same direction of the *ortho* position may form a pair at the inner and outer sides of the RBC membrane and act as one component of the lipid bilayer. On the other hand, in

case the orientation of the acyl groups is different from each other, the plasticizer molecules may be also incorporated into the lipid bilayer, but not form such a pair. The results suggested that the degree of hemolysis suppression effect is due in part to the concentration of the plasticizer eluted, but also to the structurally intrinsic ability of the plasticizer molecule. However, since the degree of the effect of PVC sheets containing DINCH or DOTP was not greatly influenced by the differences in the plasticizer content, the effect is saturated at a certain concentration. As shown in Figure 4, the hemolysis suppression effect induced by the PVC sheet spiked with DEHP, DINCH, or DOTP appeared after 35 days of incubation. The minimum amounts of these plasticizers eluted from each PVC sheet during the incubation period were 34.7 (DEHP), 13.5 (DINCH), and 61.3 (DOTP) µg/mL, respectively, while the maximum elution amount of DIDP was only 2.94 µg/mL (Table II). Taking these results into consideration, the use of plasticizer at a concentration of least more than ~10 µg/mL seems to be necessary to protect RBCs from hemolysis because the PVC sheet spiked with DIDP did not significantly prevent the hemolysis of MAP/RCC. It has been reported that the leachability of TOTM, DINCH, and diisononyl phthalate (DINP) from PVC products is significantly lower than that of DEHP.^{23,24} The reason for this phenomenon is still unknown, but it could be speculated that the degree of intermolecular interactions and/or steric hindrance between the PVC and

TABLE II. Amount of Plasticizer Eluted from PVC Sheet Incubated in MAP/RCC at 37°C During 10 Weeks Under the Conditions of Continuously Gentle Shaking.

Plasticizer	Final content (wt/w %)	Elution amount (µg/ml)									
		6 days	13 days	21 days	27 days	35 days	40 days	49 days	56 days	63 days	70 days*
TOTM	44.0	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.11±0.07	0.25±0.19	0.35±0.34	0.12±0.05	0.09±0.04	0.27±0.09
DEHP	33.7	15.0±2.60	16.2±3.52	28.3±6.78	28.5±6.06	34.7±4.54	38.8±5.57	42.4±6.22	40.1±1.15	46.0±7.86	53.1±6.07
DINCH	50.5	3.75±0.73	4.34±1.32	11.3±1.20	12.3±2.38	16.3±4.91	20.4±2.00	22.5±4.24	25.0±3.77	27.8±5.33	36.5±4.34
DIDP	44.0	3.95±0.42	5.27±1.15	9.85±1.34	11.9±2.81	15.7±3.91	19.5±2.11	21.3±3.65	24.8±3.93	29.2±2.98	32.5±4.64
	35.7	3.31±0.66	5.03±1.59	10.2±2.17	10.7±3.19	13.6±2.31	18.3±4.87	18.2±2.02	22.0±2.82	25.2±3.52	33.3±3.39
DOTP	24.5	2.88±0.51	4.40±1.13	9.34±1.95	9.92±3.55	14.2±2.91	17.3±3.20	15.5±2.67	18.9±2.48	21.3±2.09	26.1±4.79
	50.5	0.62±0.08	0.92±0.34	1.87±0.23	1.81±0.45	2.94±0.73	3.70±0.51	3.74±0.65	4.00±0.72	5.02±0.54	5.96±0.66
Control (DEHP)	44.0	0.53±0.08	1.17±0.31	1.43±0.39	1.69±0.60	2.37±0.31	3.89±0.62	4.25±0.46	4.33±0.89	4.53±1.45	5.51±0.56
	35.7	0.64±0.05	0.86±0.20	1.57±0.20	1.59±0.45	2.21±0.63	3.30±0.52	4.05±0.48	3.75±0.34	4.40±0.88	5.38±1.39
Control (DEHP)	50.5	40.8±4.67	45.6±14.7	58.4±21.1	83.0±21.9	91.9±13.9	110.5±15.1	116±12.9	123±13.3	128±26.0	150±26.0
	44.0	42.3±5.80	52.9±11.8	62.1±22.6	86.2±15.7	91.9±13.9	91.0±11.1	129±21.7	122±18.9	128±16.8	143±16.8
Control (DEHP)	35.7	26.8±7.55	36.0±12.1	53.4±15.7	71.3±18.7	73.2±12.9	97.0±23.1	112±21.2	101±11.6	94.6±16.6	117±6.00
	24.5	24.1±3.63	29.8±1.70	44.2±2.14	56.1±4.48	61.3±9.35	70.2±7.25	75.9±6.08	71.6±17.4	97.0±36.8	78.4±13.7

*No. tests amount less than LOD.

*Significant difference ($p < 0.01$) was detected between the elution amounts of DEHP and other plasticizers.

the plasticizer molecules may be related to differences in the elution behavior, depending on the type and number of the carboxy-ester groups present in the plasticizer molecule.

The type of anticoagulant and the viability of RBCs may be closely correlated with the expression of the hemolysis suppression effect of the plasticizer to RBCs.²⁵ The biochemical property of heparinized blood is very different from that of MAP/RCC, and hence, it is meaningful that the effect of the plasticizer on these two blood types is compared to evaluate the difference in the anticoagulant activity and the viability of RBCs as a typical case. DEHP, DIDP, DINCH, and DOTP exhibited a hemolysis suppression effect against MAP/RCC, but not against heparinized blood. Heparin inhibits the coagulation system by activating antithrombin, and the citrate present in CPD and MAP solutions inhibits the coagulation cascade by binding to Ca^{2+} ions (Factor IV). MAP solution has higher ability than heparin with respect to preserving the viability of RBCs because of the presence of glucose and mannitol in the solution. In fact, the lifetime of RBCs in heparinized blood is approximately half that of MAP/RCC, suggesting that the decrease in RBC viability may dominate over the stabilization of the cell membrane by these plasticizers. Probably, the ATP present in the heparinized blood was nearly depleted after 21 days, corresponding to the allowed limit of storage for human blood collected in heparin.

Recently, Hirata-Koizumi et al. reviewed the toxicity of alternative plasticizers such as DEHTP, DINCH, ATBC, diisononyl adipate (DINA), 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB), and tri-n-butyl citrate (TBC).²⁶ The overall toxicity of DOTP is still unknown. However, the results of the repeated dose toxicity, reproduction/development toxicity, bacterial reverse mutation, and chromosomal aberration tests conducted by BOZO Research Center (Shizuoka, Japan) as commissioned projects of the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare showed that there is a high possibility that the plasticizer could be used to produce medical-grade PVC products because of minimal toxicity. These data are uploaded in the websites (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/pdf/PDF2915-49-3d.pdf, http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/pdf/PDF2915-49-3e.pdf, and http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/pdf/PDF2915-49-3f.pdf). DOTP is a cold-resistant plasticizer and has been used to produce a power-transmission line. Cold resistance of DOTP higher than that of DEHP may provide an advantage with respect to preventing cracking, which rarely occurs during cryopreservation of DEHP-PVC containers for blood products such as human plasma. The amount of DOTP eluted from the PVC sheet is relatively higher than that of DEHP, but that amount could be artificially adjusted to the minimal amount to suppress hemolysis (~10 µg/mL as described above) by decreasing the mixing ratio of DOTP to PVC and mixing precise doses of plasticizers with low leachability, such as DINCH or TOTM, to reduce patient exposure to these substances during medical treatments. The amount of plasticizers eluted from heat-pressed PVC sheets seems to be higher than that from T-die molded PVC sheets used to manufacture commercial PVC products. A possible reason

for this behavior could be the different orientation and density of the PVC molecules present in the sheets. In addition, the conditions used in this study are different from typical RBC storage because the blood was not leukocyte-reduced and was continuously in contact with the air present in the bottle head. On the basis of these results, preparation of a novel blood container prototype made from PVC sheets containing DOTP instead of DEHP and studies on the chemical, physicochemical, biological, and dynamical characteristics of the prototype are now in progress in our laboratory.

CONCLUSIONS

DINCH and DOTP are possible candidates as a replacement for DEHP in RBC storage bags because of their hemolysis suppression abilities. Although DIDP itself was effective in suppressing hemolysis, it could not be used as an alternative plasticizer because the amount of DIDP eluted from the PVC sheet did not reach the concentration essential for exhibiting its suppression effect.

REFERENCES

- Allwood MC. The release of phthalate ester plasticizer from intravenous administration sets into fat emulsion. *Int J Pharm* 1986; 29:233-236.
- Lof S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, Waag KL. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg* 2000;35:1775-1781.
- Poon R, Lecaualier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. Sub-chronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol* 1997;35:225-239.
- Lamb JC, Chapin RE, Taugu J, Lawton AD, Reel JR. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;88:255-269.
- Tyl RW, Price JC, Marr MC, Kimmel CA. Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 1988;10:395-412.
- Riechburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl)phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;137:42-50.
- Lee J, Riechburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinol* 1999;140:852-858.
- Riechburg JH, Nanex A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K. Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinol* 2000;141:787-793.
- Lovekamp TN, Davis BJ. Mono-(2-ethylhexyl)phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;172:217-224.
- Habert R, Muczynski V, Lohraki A, Lambert R, Lecureuil C, Lavacher C, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Rouiller-Fabra V. Adverse effects of endocrine disruptors on the foetal testis development: focus on the phthalates. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47:567-574.
- Lambert R, Muczynski V, Lecureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabra V. Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 2009;117:32-37.
- Reinsberg J, Wegener-Topfer P, van der Ven K, van der Ven H, Klingmueller D. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;239:116-123.
- Silva MJ, Furr J, Preau JL Jr, Samard E, Fray LE, Calafat AM. Identification of potential biomarkers of exposure to diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH), an alternative for phthalate plasticizers. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2012;22:201-211.
- Nair CS, Vidya R, Ashalatha PM. Hexamol DINCH plasticized PVC containers for the storage of platelets. *Asian J Transfus Sci* 2011; 5:18-22.
- AuBuchon JP, Estepe TN, Davey RJ. The effect of the plasticizer di-2-ethylhexyl phthalate on the survival of stored RBCs. *Blood* 1988;71:448-452.
- Haishima Y, Isama K, Hasegawa C, Yuba T, Matsuoka 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 A* 2013;101A: 2630-2643.
- Dumont LJ, Baker S, Dumont DF, Herschel L, Waters S, Calcagni K, Sandford C, Radwanski K, Min K, David RM, Otter R. Exploratory in vitro study of red blood cell storage containers formulated with an alternative plasticizer. *Transfusion* 2012; 52:1439-1445.
- Ito R, Seshimo F, Haishima Y, Hasegawa C, Isama K, Yagami T, Nakahashi K, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y, Saito K, Tsuchiya T, Nakazawa H. Novel approach for reducing migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical device. *Int J Pharm* 2005;303:104-112.
- Haishima Y, Seshimo F, Higuchi T, Yamazaki H, Hasegawa C, Izumi S, Makino T, Nakahashi K, Ito R, Inoue K, Yoshimura Y, Saito K, Yagami T, Tsuchiya T, Nakazawa H. Development of a simple method for predicting the levels of di(2-ethylhexyl)phthalate migrated from PVC medical devices into pharmaceutical solutions. *Int J Pharm* 2005;298:126-142.
- Haishima Y, Matsuoka R, Hayashi Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T. Risk assessment of di(2-ethylhexyl) phthalate eluted from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy. *Int J Pharm* 2004;274:119-129.
- Kawakami T, Isama K, Matsuoka A. Analysis of phthalic acid diesters, monoester, and other plasticizers in polyvinyl chloride household products in Japan. *J Environ Sci Health A* 2011;46: 855-864.
- Hayashi Y, Matsuoka R, Haishima Y, Yagami T, Nakamura A. Validation of HPLC and GC-MS systems for bisphenol-A leached from hemodialyzers on the basis of FUMI theory. *J Pharm Biomed Anal* 2002;28:421-429.
- Kambila K, Dine T, Azer R, Gressler B, Luyckx M, Brunet C. Comparative study of the feasibility of di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing. *Int J Pharm* 2001;229:139-146.
- Holmgren T, Persson L, Andersson PL, Haglund P. A generic emission model to predict release of organic substances from materials in consumer goods. *Sci Total Environ* 2012;437:308-314.
- Burger P, Korsten H, Verhoeven AJ, Korte D, Bruggen R. Collection and storage of red blood cells with anticoagulant and additive solution with a physiological pH. *Transfusion* 2012;52:1245-1252.
- Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Matsumoto M, Kawamura T, Ono A, Hirose A. Toxicity effects of phthalate substitute plasticizers used in toys. *Kokuritu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* 2012;130:31-42.

58
(4)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する資料⑨

J. Biomed. Mater. Res. Part B, 102B:1809-1816 (2014)

Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing

Yuji Haishima,^{1*} Chie Hasegawa,¹ Yusuke Nomura,¹ Tsuyoshi Kawakami,² Toshiyasu Yuba,³ Tomoko Shindo,⁴ Keisuke Sakaguchi,⁵ Takahiro Tanigawa,⁵ Kaori Inukai,⁵ Mika Takenouchi,⁵ Kazuo Isama,² Atsuko Matsuoka,⁶ Shingo Niimi¹

¹Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

²Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

³Kawasumi Laboratories, Inc., Corporate Research and Development Division, Shinagawa Intercity Tower B, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-6109, Japan

⁴Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

⁵R&D Headquarters, Evaluation Center, TERUMO Corporation, 1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-0151, Japan

⁶Office of Standards and Guidelines Development, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

Received 3 September 2013; revised 24 February 2014; accepted 19 March 2014

Published online 8 April 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.33169

Abstract: This study deals with the development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing, which is used for evaluating the biological safety of medical devices. Genapol X-080, a nonionic detergent, was selected as a candidate hemolytic substance in a survey of 23 chemical compounds; it showed significant hemolytic activity against rabbit defibrinated blood at concentrations more than 20 µg/mL. A polyvinyl chloride (PVC) sheet spiked with 0.6% (w/w) of the compound exhibited weak hemolytic activity in direct contact and/or extract-based assays after 4 h incubation at 37°C. A PVC sheet containing 5.8% (w/w) Genapol X-080 induced complete hemolysis in both assays. The amount of Genapol X-080 eluted from each PVC sheet during hemolysis testing using the direct contact method increased time-dependently and reached 25.6 (former sheet) or 1154 (later sheet) µg/mL after 4 h incubation, which

was similar to or much higher than the critical micelle concentration, respectively. Similar elution behavior was observed using the extract-based method, and the Genapol X-080 content in test solutions prepared by autoclave extraction of both sheets was 22.5 and 358 µg/mL, respectively, indicating a clear relationship between the degree of hemolytic activity and the eluted amount of Genapol X-080. Thus, a PVC sheet spiked with a compound exhibiting different hemolytic activity depending on its concentration may be useful as a positive reference material to validate the hemolysis tests. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 102B: 1809–1816, 2014.

Key Words: hemolysis test, positive control, biological safety evaluation, guidance

How to cite this article: 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. 2014. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J Biomed Mater Res Part B* 2014;102B:1809–1816.

INTRODUCTION

Biological safety evaluation of raw materials or medical devices must be conducted using risk analysis techniques specified in ISO 14971.¹ The intended use or purpose and the safety properties of a medical device must be clarified or known foreseeable hazards must be identified, and the risk of each hazard must be anticipated. Items to be evaluated to determine the biological safety of each medical device are selected according to the requirements specified in ISO 10993-1.²

As a general rule, the items must be evaluated depending on their categorization in accordance with the nature of body contact and the duration of contact. Hemocompatibility testing is required to evaluate the safety of a medical device or material that has contact with blood.^{3–7} Hemolysis testing is a part of hemocompatibility testing, which involves tests for thrombosis, coagulation, platelets, hematology, and the complement system. Mechanical and biochemical factors affect hemolysis. For medical devices such as membrane

Correspondence to: Y. Haishima (e-mail: haishima@nihs.go.jp)

Contract grant sponsor: Health and Labor Sciences Research Grants (Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare); contract grant number: H23-CHIKYUKIBO-SHITEI-003 and H25-CHIKYUKIBO-SHITEI-008

TABLE I. List of a Candidate of Hemolytic Compound and the Hemolytic Activity Estimated by Simple Hemolysis Test Method

Compound (manufacturer No.) ^a	Dissolved solvent	Final concentration for test (µM)	Hemolytic ratio (%) ^d
Triphenyl phosphate (1)	DMSO ^b	500	0.5
Lactic acid (1)	PBS	5	1.3
Orcinol anhydrous (1)	PBS	50	0.9
Lead acetate (1)	PBS	50	1.0
Sodium chlorate (1)	PBS	50	0.7
Diphenyl disulfide (2)	DMSO	500	93.0
Dimethylglyoxime (1)	DMSO	500	0.3
3-Phenylazo-2,6-diaminopyridine monohydrochloride (2)	DMSO	500	0.6
5-Aminosalicylic acid (1)	DMSO	500	0.4
4-Nitroaniline (1)	DMSO	500	0.7
<i>o</i> -Aminophenol (3)	DMSO	500	6.3
Aniline (1)	DMSO	500	0.4
<i>p</i> -Aminodiphenylamine (1)	DMSO	500	0.3
2-Nitrophenylhydrazine hydrochloride (2)	DMSO	500	0.3
Sulfasalazine (2)	DMSO	500	1.4
Nitrobenzene (1)	DMSO	500	0.5
Resorcinol(1)	DMSO	500	1.2
Genapol X-080 (3)	DMSO	50 ^c	100.9
2,4,6-Trinitrophenyl (1)	DMSO	500	0.3
Zineb standard (4)	DMSO	500	8.6
D-Penicillamine hydrochloride (5)	DMSO	500	0.6
1-Naphthylamine (3)	DMSO	500	0.4
<i>p</i> -Aminosalicylic acid sodium salt dihydrate (5)	DMSO	500	0.3

^a (1) Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan), (2) Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japan), (3) Sigma-Aldrich Co. (Tokyo, Japan), (4) Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan), and (5) MP Bio Japan K.K. (Tokyo, Japan).

^b Compound dissolved in DMSO was diluted to 100 folds with PBS at the final concentration for hemolysis test.

^c µg/mL.

^d Hemolytic ratio after 4 h incubation.

oxygenators or hemodialyzers that may physically damage blood cells, the test should be designed considering mechanical factors, for example, using a blood circulation system. For devices that have little mechanical impact on blood cells, established static or semi-static *in vitro* testing can be used. This testing may be also useful for devices with mechanical impact on blood to evaluate the impact of materials on hemolysis.

Biological testing methods have to be validated to confirm that test results meet the requirements for evaluating safety in clinical use.^{2,3} Negative and positive reference materials or positive control substances have been used in biological safety evaluation tests such as cytotoxicity, sensitization, genotoxicity, and implantation tests to detect toxicity in test samples and to certify the validity of the test system. However, no reference materials have been used for hemolysis testing to date.

Hemolysis is a phenomenon accompanied by the rupture of erythrocytes and the release of their cytoplasm into the surrounding fluid; thus, the cell membrane is damaged by physical, chemical, and biological factors. Certain types of snake and vespid venoms^{8,9} with phospholipase A₂ activity and bacterial exotoxins^{10–12} produced by pathogenic microbes (e.g., *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*) are known as typical hemolysins, but considering the safety, stability, and cost

performance of potential positive reference materials, a candidate hemolytic substance should be selected from commercially available chemical compounds.

In this study, we developed a positive reference material made of a plasticized polyvinyl chloride (PVC) sheet that shows strong or weak hemolytic activity dependent on the content of Genapol X-080, selected as a candidate hemolytically toxic substance, based on results obtained using 23 types of chemical compounds, and we evaluated the performance of this material as a positive reference material in three types of official test methods used in Japan and the USA.

MATERIALS AND METHODS

Materials, chemicals, and utensils

Twenty-three types of chemicals selected as candidate hemolytic compounds and their suppliers are listed in Table I. Dimethyl sulfoxide (DMSO) of molecular biology grade, sodium citrate, sodium carbonate, ammonium thiocyanate, cobalt (II) nitrate hexahydrate, nitric acid for analysis of poisonous metals, metal standard solution (Co and Ag), and Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Tokyo, Japan). Toluene of pesticide residue and PCB analysis grade and Drabkin reagent were purchased from Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan), and 4-(2-pyridylazo)-

resorcinol (PAR) was purchased from Dojindo Molecular Technologies (Kumamoto, Japan). The hemoglobin standard was purchased from Alfresa Pharma Corporation (Osaka, Japan). All utensils made of glass, metal, or Teflon[®] used to prepare samples for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis were heated at 250°C for more than 16 h prior to use.

Animal blood

The rabbit defibrinated blood used in simple hemolysis testing for a candidate hemolytic compound as described below was purchased from Kohjin Bio (Saitama, Japan). For hemolysis tests provided by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare (MHLW), rabbit defibrinated blood was prepared in our laboratory according to Japanese guidelines.⁷ For hemolysis tests provided by the American Society of Testing and Materials (ASTM) and the National Institutes of Health (NIH),^{5,6} fresh-drawn rabbit blood was anticoagulated by adding sodium citrate at a final concentration of 0.38 w/v% and stocked at 4°C until use. New Zealand white rabbits and Japanese white rabbits were used in this study, and the drawn blood was directly used for hemolysis testing without washing the blood cells. The procedure was performed in accordance with the ethical guidelines on animal experiments of the Hatano Research Institute of the Food and Drug Safety Center (approval number 1120331A) and Terumo Corporation (approval number 120163).

Preparation of PVC sheet

PVC powder (100 g) was added gradually to a mixture of DEHP (55 g) and ESBO (8 g) containing different amounts of Genapol X-080 or diphenyl disulfide (0, 0.01, 0.1, 1.0, and 10 g, respectively; final concentration = 0, 0.006, 0.06, 0.6, and 5.8% [w/w]) under stirring with a spatula. The mixed powder was gently heated from room temperature to 100°C in an oven and then stirred well. The powder was stirred a second time after heating at 100°C for 5 min to completely plasticize the PVC. The plasticized powder was heat-pressed at 180°C to prepare the PVC sheets (thickness = 0.4 mm). Each sheet was cut into small pieces (1 × 3 cm²).

Simple hemolysis testing to survey a candidate hemolytic compound

Purchased rabbit defibrinated blood (1 mL) was placed into a screw-capped test tube and centrifuged at 700g for 5 min at 4°C. The supernatant was removed, and PBS (10 mL) was added to the sedimented red blood cells (RBC) and then gently mixed. After centrifugation at 700g for 5 min at 4°C, the supernatant was removed, and this step was repeated two times to wash RBCs. The RBC sediment was finally suspended in PBS of equal volume to original sample and stored at 4°C until use.

Hydrophilic compounds were dissolved in PBS (1 mL) at the final concentration shown in Table 1, and the washed RBC suspension (20 μL) was added to the solution and then gently mixed. After incubation at 37°C for 1, 2, and 4 h, each sample was centrifuged at 700g for 5 min at 4°C, and then the absorbance of the supernatant (100 μL) was

measured at 415 nm using a SH-9000 Lab microplate reader (Corona Electric, Ibaraki, Japan). The RBC suspension in PBS alone was also tested under the same conditions as a negative control, whereas a positive control was prepared using distilled water instead of PBS. The calculated amount of the hydrophobic compound was dissolved in DMSO, and the solution was diluted 100-fold with PBS at the final concentration listed in Table 1. The washed RBC suspension (20 μL) was immediately added to the diluted sample (1 mL), and then hemolytic behavior was estimated using the same method.

The hemolytic behavior of Genapol X-080 and diphenyl disulfide exhibiting high hemolytic activity against RBC was additionally estimated in detail at concentrations from 0.1 to 50 μg/mL for Genapol X-080 and from 50 to 100 μM for diphenyl disulfide.

These tests were performed in duplicate. The hemolytic ratio was calculated in accordance with the following formula.

$$\% \text{Hemolysis} = \frac{(A_T - A_N)}{(A_P - A_N)} \times 100.$$

where A_T is the test sample absorbance, A_N is the average negative control mean absorbance, and A_P is the average positive control mean absorbance.

Hemolysis testing of PVC sheet spiked with hemolytic compound

This test was performed using four methods: a simple method used to survey a candidate hemolytic compound, and official methods provided by ASTM, NIH, and Japanese MHLW guidelines.⁵⁻⁷ PVC sheets (5 g for the NIH method or 1 × 3 cm² for the other methods) containing different amounts of Genapol X-080 or diphenyl disulfide were cut into small pieces and placed into a screw-capped glass bottle. A PVC sheet containing no Genapol X-080 or diphenyl disulfide was used as a negative material control.

In the simple method, 1 mL of PBS and 20 μL of washed, suspended RBCs prepared according to the procedure described above were added to the bottle containing the test pieces for the direct contact hemolysis test. In the extraction method, 1 mL of PBS was added to the bottle and autoclaved at 121°C for 1 h to make the test solution, and then the washed RBC suspension (10 μL) was added to 0.5 mL of each test solution replaced into another glass tube. After incubation at 37°C for 1, 2, and 4 h, the hemolytic ratio of each sample was measured according to the same method described above.

For ASTM direct contact hemolysis testing, PBS (7 mL) and 1 mL of rabbit blood anticoagulated with sodium citrate were used to adjust the hemoglobin concentration to 9.456 mg/mL, and they were added to the bottle containing sample pieces. For the ASTM extract method, PBS (8 mL) was added to the bottle and autoclaved (121°C, 1 h) to prepare the test solution. Citrated rabbit blood (1 mL) was added to 7 mL of the test solution replaced into another glass bottle. Each sample was incubated at 37°C for 3 h under gentle

mixing followed by centrifugation at 800g for 15 min. The supernatant (1 mL) was mixed with Drabkin reagent (1 mL) and the absorbance was measured at 540 nm after incubation at room temperature for 15 min. The hemoglobin concentration in each sample was calculated according to a standard curve.

For the NIH direct contact method, rabbit blood (8 mL) anticoagulated with sodium citrate was diluted with saline (10 mL). The diluted blood (0.2 mL) was hemolyzed by adding 0.1 w/v% sodium carbonate solution (10 mL), and the absorbance at 545 nm was adjusted to the range of 0.9–1.0 by adding saline or blood. Saline (10 mL) was added to the bottle containing the sample pieces and pre-incubated at 37°C for 30 min. The blood adjusted according to the absorbance (0.2 mL) was added to the glass tube and incubated at 37°C for 1 h. After centrifugation at 500g for 5 min, the absorbance of the supernatant was measured at 545 nm.

For the Japanese MHLW extract hemolysis test, the test solution was prepared by autoclave extraction (121°C, 1 h) with saline, and 0.2 mL of rabbit defibrinated blood freshly prepared in our laboratory was added to 10 mL of the test solution, followed by incubation at 37°C for 4 h. After centrifugation at 750g for 5 min, the supernatant (0.5 mL) was mixed with Drabkin reagent (4.5 mL) and incubated at room temperature for 20 min followed by measurement of the absorbance at 540 nm.

Negative and positive controls and the hemolysis ratio were prepared or calculated in accordance with the method provided by the guidelines. These tests were performed in triplicate, and significant differences were calculated by two-way analysis of variance.

Elution testing of Genapol X-080 from the PVC sheet

The amount of Genapol X-080 eluted from the PVC sheet was quantified by ICP-MS analysis as the amount of cobalt (II)-formed complex produced according to a previously reported method.^{13,14} Briefly, 1 mL of PBS and 20 μL of washed RBC suspension were added to the bottle containing the test pieces of the PVC sheet (1 × 3 cm²) spiked with different amounts of Genapol X-080. After incubation for 1, 2, and 4 h, 500 μL of each sample solution was replaced into another screw-capped glass tube, and 500 μL of test solution prepared by autoclave extraction of the test pieces with PBS (1 mL) was also sampled into another tube. PBS (0.5 mL), toluene (6 mL), and a mixture (3 mL) of ammonium thiocyanate (456 g/L) and cobalt (II) nitrate hexahydrate (46.6 g/L) solutions (1:1, v/v) were added to each sample and shaken for 15 min at room temperature followed by centrifugation at 2500 rpm for 3 min. PAR solution (1 mL, 0.01 g/L, pH 9.5) was added to 5 mL of the supernatant (toluene layer), and gently shaken for 3 min followed by centrifugation. The water layer was sampled for ICP-MS analysis. PBS containing Genapol X-080 in a concentration range from 1.0 to 200 μg/mL was also treated using the same method to generate a standard curve. This test was repeated in triplicate.

ICP-MS analysis

The sample solution was diluted appropriately 100–400-fold with 5 v/v% nitric acid and filtered through a

membrane filter (pore size 0.45 μm, Sartorius Stedim, Goettingen, Germany). The concentration of Co ($m/z = 59$) in the sample solution was determined by ICP-MS (Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using an octopole reaction system.^{15,16} Helium gas was used as the collision gas. The operation conditions of ICP-MS were as follows: RF power 1500 W; argon plasma gas 15 L/min; nebulizer gas 0.7 L/min; make-up gas 0.33 L/min; helium collision gas 5 mL/min; spray chamber temperature 2°C; integration time 0.1 s; three replicates. Ag ($m/z = 107$) was used as an internal standard (5 μg/L in 5% nitric acid solution) for quantification of the Co concentration. The method limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for Co in the final sample solution were calculated as follows¹⁷:

$$\text{LOD} = 3 \times \rho$$

$$\text{LOQ} = 14.1 \times \rho$$

where ρ is the standard deviation obtained from the results of a control blank sample (only PBS, $n = 10$). The LOD and LOQ of Co thus obtained were 6.67 and 31.7 ng/L, respectively. The background equivalent concentration (BEC) of Co in this study was 1.25 ng/L. Linearity ($r = 0.997$) of the standard curve used to quantify Genapol X-080 was observed in the concentration range from 1.0 to 200 μg/mL, and hence, the LOQ for Genapol X-080 was set at 1.0 μg/mL.

RESULTS

Hemolytic activity of a candidate compound

The 23 chemicals listed in Table 1 were selected as candidate hemolytic compounds according to previous reports,^{18–20} and the hemolytic behavior against rabbit RBCs was estimated using a simple survey method. As shown in Table 1, although most of the compounds did not exhibit hemolytic activity under the conditions used in this study, Genapol X-080 and diphenyl disulfide significantly induced hemolysis. As shown in Figure 1(a), the activity of Genapol X-080 remarkably increased at concentration higher than approximately 20–25 μg/mL. Diphenyl disulfide exhibited hemolytic activity in a concentration-dependent manner in the concentration range from 50 to 100 μM [Figure 1(b)].

Preliminary study on the hemolytic activity of the PVC sheet spiked with Genapol X-080 or diphenyl disulfide

To confirm its availability as a positive reference material, the hemolytic behavior of PVC sheets spiked with different amounts of Genapol X-080 or diphenyl disulfide was preliminarily estimated using a simple method.

As shown in Figure 2(a), although PVC sheets containing 0.006% or 0.06% (w/w) Genapol X-080 did not exhibit significant hemolytic activity when compared with PBS (control) and the negative material control, the PVC sheet spiked with 0.6% (w/w) Genapol X-080 induced weak hemolysis of RBCs in the direct contact method, and the hemolytic ratio reached 37.4% after 4 h of incubation. In addition, complete hemolysis was induced by the PVC sheet containing 5.8%

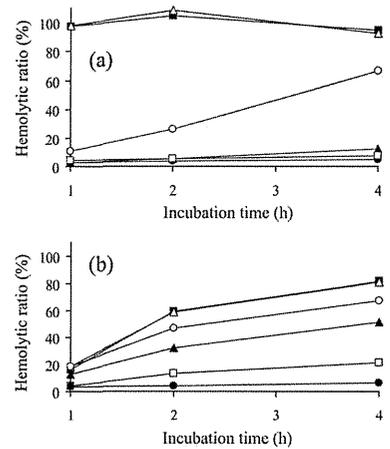


FIGURE 1. Hemolytic behavior of Genapol X-080 (a) and diphenyl disulfide (b) estimated by the simple method. Concentration of Genapol X-080: ●, 1; □, 10; ▲, 20; ○, 25; △, 30; ■, 40 µg/mL. Concentration of diphenyl disulfide: ●, 50; □, 60; ▲, 70; ○, 80; △, 90; ■, 100 µM. The hemolytic ratio of negative control (PBS) after incubation for 1, 2, and 4 h was 4.2%, 4.8%, and 7.2%, respectively.

(w/w) Genapol X-080 independently of incubation time. Similar hemolytic behavior was observed for the extract-based method as shown in Figure 2(b), in which the test solution prepared by autoclave extraction of PVC sheets spiked with 0.6% or 5.8% (w/w) Genapol X-080 exhibited weak or strong hemolysis, respectively, but no activity was observed for extracts from PVC sheets containing 0.006% or 0.06% (w/w) Genapol X-080.

In contrast, the PVC sheet containing diphenyl disulfide did not exhibit hemolytic activity in the direct contact and/or extraction methods, despite the presence of the spiked diphenyl disulfide as shown in Figure 3.

Performance evaluation of PVC sheet spiked with Genapol X-080 as a positive reference material

The hemolytic activity of PVC sheets spiked with Genapol X-080 was also estimated using three official methods to certify the sheet as a positive reference material for hemolysis testing. As shown in Figure 4, the hemolytic behavior of the sheet detected by the ASTM direct contact method was almost identical to that in the simple method used in the preliminary survey, in which the PVC sheet containing 0.6% or 5.8% (w/w) Genapol X-080 induced weak (hemolytic ratio = 21.1%) or strong (hemolytic ratio = 92.4%) hemolysis, respectively, but no hemolysis was observed for the other two sheets spiked with relatively low amounts of the

compound. Similar hemolytic behavior was also yielded by the ASTM or Japanese MHLW extract-based method and the NIH direct contact method, in which PVC sheets spiked with the highest amount of Genapol X-080 induced complete hemolysis (Figure 4). However, a PVC sheet spiked with 0.6% (w/w) Genapol X-080 did not exhibit significant hemolytic activity, which was different from the results in the ASTM direct contact method and the simple method used to survey the candidate hemolytic compound.

Amount of Genapol X-080 eluted from the PVC sheet

The amount of Genapol X-080 eluted from the PVC sheet was measured by ICP-MS analysis to elucidate the correlation with the hemolytic behavior of the sheet. In the direct contact method, the amount eluted from PVC sheets spiked with 0.6% or 5.8% (w/w) Genapol X-080 increased over time and reached 25.6 or 1154 µg/mL, respectively, after 4 h of incubation as shown in Table II. The test solution prepared by autoclave treatment for the extract-based method contained 22.5 (former sheet) or 358 (later sheet) µg/mL Genapol X-080, respectively. In contrast, the amount eluted from the PVC sheet containing the lowest amount of Genapol X-080 was less than the LOQ in the direct contact and/or extract-based methods. No significant elution was observed from the PVC sheet spiked with 0.06% (w/w) Genapol X-080, except for 3.75 µg/mL Genapol X-080 detected after incubation for 4 h using the direct contact method.

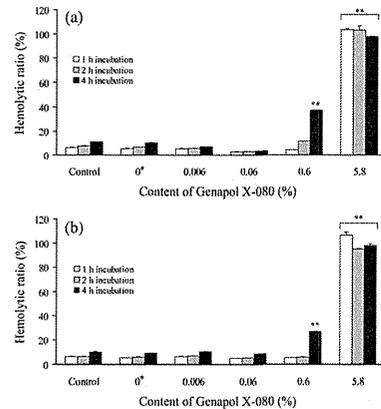


FIGURE 2. Hemolytic behavior of PVC sheets spiked with different amounts of Genapol X-080 estimated by direct contact (a) and extract-based (b) assays using the simple method. In addition to PBS alone (negative control), a PVC sheet containing no Genapol X-080 was used as a negative material control. **Significant differences ($p < 0.01$) were detected between these data points and other data points.

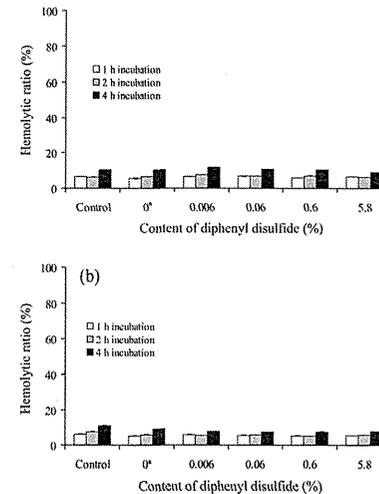


FIGURE 3. Hemolytic behavior of PVC sheets spiked with different amounts of diphenyl disulfide estimated by direct contact (a) and extract-based (b) assays using a simple method. In addition to PBS alone (negative control), a PVC sheet containing no diphenyl disulfide was used as a negative material control.

DISCUSSION

This investigation attempted to develop a positive reference material for certifying the validity of hemolysis tests, which are used for evaluating the hemocompatibility of medical devices. From the survey of 23 chemical compounds, Genapol X-080 and diphenyl disulfide were selected as candidates.

Genapol X-080 is a polyethyleneglycol (PEG) monoalkyl ether that is used as a general-purpose non-ionic detergent, and it has been widely used in various fields including cosmetics. Alkyl PEG ethers were not genotoxic at a concentration of 1000 mg/L,²¹ and no evidence of systemic toxicity or sensitization was found for intact skin.²² Recently, the Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel assessed the safety of alkyl PEG ethers used in cosmetics and concluded that they are safe as used in cosmetic products.²³ Taking these findings into consideration, it seems that this compound is safe for handling and useful as an ingredient for preparing a positive reference material for hemolysis testing. Genapol X-080 induces hemolysis of RBCs by destroying the cell membrane through the detergent effect at concentrations higher than the critical micelle concentration (CMC), which may be approximately 25 µg/mL according to the hemolytic behavior of the compound [Figure 1(a)]. PVC sheets spiked with 0.6% or 5.8% (w/w) Genapol X-080

exhibited weak or strong hemolysis, respectively, in the direct contact and/or extract-based assays using the simple method. In the direct contact method, the amount of Genapol X-080 eluted from the PVC sheets increased over time and reached 25.6 (0.6% [w/w] sheet) and 1154 (5.8% [w/w] sheet) µg/mL after 4 h incubation, corresponding approximately to the CMC or much higher than the CMC, respectively. The Genapol X-080 content in the test solution prepared by autoclave extraction was also similar to or higher than the CMC. Thus, a clear relationship was observed between the degree of hemolytic activity and elution amount of Genapol X-080. In addition, identical or similar hemolytic behavior was also yielded by the ASTM, NIH, and Japanese MHLW methods according to the protocol for inter-laboratory hemolysis round robin testing produced by ISO/TC 194/WG 9, which was implemented in April 2013. Although weak hemolytic activity induced by the PVC sheet spiked with 0.6% (w/w) Genapol X-080 was not detected by official methods other than the ASTM direct contact method, the detection may be improved by slightly increasing the spiked amount of the compound. The Genapol X-080 content in the test solution prepared by autoclave extraction of the PVC sheet spiked with the highest amount of the compound was considerably lower than the amount eluted from the sheet during the hemolysis test using the direct contact method. The difference in elution amount may originate from the physicochemical properties of Genapol X-080 because the solubility of the compound markedly decreases at temperatures higher than the cloud point (74°C–76°C). These data clearly indicate that a PVC sheet spiked with Genapol X-080 exhibiting different hemolytic activity dependent on the Genapol X-080 content may be useful as a positive reference material to certify the validity of hemolysis tests.

It has been reported that aromatic disulfides induce hemolysis of erythrocytes,^{19,20} and in fact, diphenyl disulfide itself also exhibited significant hemolytic activity in this study. This compound induces hemolysis as the result of biological effects in erythrocytes such as hydrogen

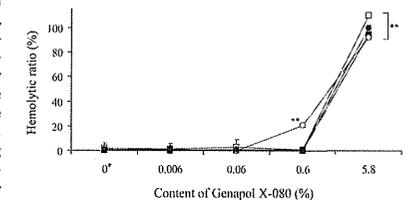


FIGURE 4. Hemolytic behavior of PVC sheets spiked with different amounts of Genapol X-080 estimated by official methods for hemolysis testing provided by ASTM, NIH, and the Japanese MHLW. ■, ASTM extract-based method; □, ASTM direct contact method; ●, NIH direct contact method; ▲, Japanese MHLW extract-based method. *PVC sheet containing no Genapol X-080 was used as a negative material control. **Significant differences ($p < 0.01$) were detected between these data points and other data points.

TABLE II. Amount of Genapol X-080 Eluted from PVC Sheet During Hemolysis Test with Direct Contact Method or into Test Solution for the Extract Method

Genapol X-080 content in PVC sheet (% [w/w])	Amount of Genapol X-080 ($\mu\text{g/mL}$) eluted from PVC sheet in			
	Direct contact method after incubation for			Extract method
	1 h	2 h	4 h	
0.006	-*	-	-	-
0.06	-	-	3.75 \pm 0.12	-
0.6	6.20 \pm 0.21	21.2 \pm 0.43	25.6 \pm 0.70	22.5 \pm 0.32
5.8	362 \pm 5.0	523 \pm 14.8	1154 \pm 31.6	358 \pm 6.4

*less than LOQ.

peroxide production, hemoglobin oxidation, and destruction of nonprotein thiols and protein-bound thiols.²⁴ Although diphenyl disulfide itself seemed to be superior to Genapol X-080 as a candidate hemolytic compound with regard to the wide range of concentrations that induced hemolysis, PVC sheets spiked with diphenyl disulfide exhibited no hemolytic activity in the direct contact and/or extract-based methods. The reason is unknown, but it is speculated that although diphenyl disulfide itself may be heat-stable, because its hemolytic activity was maintained even after heating at 200°C for 10 min (data not shown), it may interact with DEHP, ESBO, or PVC molecules during the heat-press process used to make the PVC sheet. In fact, PVC sheets prepared by casting a tetrahydrofuran solution containing the calculated amounts of plasticized PVC and diphenyl disulfide induced hemolysis of RBCs (data not shown). However, it was finally decided that the PVC cast sheet was not useful as a positive reference material for hemolysis testing because the degree of hemolytic activity was independent of the spiked amount and the reproducibility of the data was low (data not shown), probably because the amount of diphenyl disulfide eluted from the PVC sheet may have varied according to the hydrophobicity of the compound.

It is known that most plastic products do not exhibit significant hemolytic activity against RBCs. In fact, we have also confirmed that no hemolytic activity is present in commercially available plastic sheets made from polycarbonate, acrylate, and terephthalate (data not shown), which indicates that these sheets can be used as a negative reference material for hemolysis testing. Although there is a possibility that the method used to form the sheets will be changed suddenly without any publicity, plastic products that can be used as a negative reference material may be easily found and purchased at any time. Thus, the use of efficient positive and negative reference materials to certify the validity of hemolysis tests is now possible, and our next step is to establish a reliable supply of a positive reference material containing Genapol X-080.

CONCLUSIONS

PVC sheets spiked with Genapol X-080 exhibiting different hemolytic activity dependent on the Genapol X-080 content may be useful as a positive reference material to certify the validity of hemolysis tests.

REFERENCES

- ISO 14971:2007. Medical devices—Application of risk management to medical devices.
- ISO 10993-1:2009. Biological evaluation of medical devices—Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.
- Japanese domestic committee of ISO/TC 194. Basic principles for biological safety evaluation of medical devices. 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. pp 11–21.
- ISO 10993-4:2002/Amd.1:2006. Biological evaluation of medical devices—Part 4: Selection of tests for interaction with blood.
- ASTM Standard F756-08:2008. Practice for assessment of hemolytic properties of materials. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- National Institute of Health: 1977. Evaluation of hemodialyzers and dialysis membranes. Hemolysis-Rabbit Blood. DHEW Publication 77-1294. Bethesda, MD.
- 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. pp 189–203.
- Jeng TW, Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic, and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:600–604.
- Wataha C, Kowalczyk JK. Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms. *Comp Biochem Physiol C* 1990;97:187–194.
- Inoue K, Akiyama Y, Kinoshita T, Higashi Y, Amano T. Evidence for a one-hit theory in the immune bactericidal reaction and demonstration of a multi-hit response for hemolysis by streptolysin O and *Clostridium perfringens* theta-toxin. *Infect Immun* 1976;13:337–344.
- Lock RA, Zhang QY, Berry AM, Paton JC. Sequence variation in the *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin gene affecting haemolytic activity and electrophoretic mobility of the toxin. *Microb Pathog* 1996;21:71–82.
- Habart GA, Hancock GA. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. *J Clin Microbiol* 1985;22:409–415.
- Goldstein S, Blecher M. The spectrophotometric assay for polyethoxy nonionic detergents in membrane extracts: A critique. *Anal Biochem* 1975;64:130–135.
- Hoshino H, Yotsuyanagi T. Spectrophotometric studies on ion-pair extraction equilibria of the iron (II) and iron (III) complexes with 4-(2-pyridylazo)resorcinol. *Talanta* 1984;31:525–530.
- Ogra Y, Ishiwata K, Suzuki KT. Effects of deuterium in octopole reaction and collision cell ICP-MS on detection of selenium in extracellular fluids. *Anal Chim Acta* 2005;554:123–129.
- Halatek T, Sinczuk-Walczak H, Robieth S, Wasowicz W. Association between occupational exposure to arsenic and neurological, respiratory and renal effects. *Toxicol Appl Pharm* 2009;239:193–199.
- Japanese Industrial Standards Committee, JIS K 0133: General rules for high frequency plasma mass spectrometry, 2007.
- Yamashita M. Hemolysis. *Chudoku Kenkyu* 1988;1:149–157.

- Munday R. Toxicity of aromatic disulphides. II. Intra-erythrocytic hydrogen peroxide formation and oxidative damage by aromatic disulphides. *J Appl Toxicol* 1985;5:409–413.
- Munday R, Manns E. Toxicity of aromatic disulphides. III. In vivo haemolytic activity of aromatic disulphides. *J Appl Toxicol* 1985;5:414–417.
- Lwarska-Bizukojc E, Miksch K, Malachowska-Jutcz A, Kalka J. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and non-ionic surfactants. *Chemosphere* 2005;58:1249–1253.
- Hofland HE, Bouwstra JA, Verhoef JC, Buckton G, Chowdry BZ, Ponec M, Junginger HE. Safety aspects of non-ionic surfactant

- vesicles: A toxicity study related to the physicochemical characteristics of non-ionic surfactants. *J Pharm Pharmacol* 1992;44:287–294.
- Fiume MM, Heldreth B, Bergfeld WE, Beisito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, Marks JG, Jr, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Safety assessment of alkyl PEG ethers as used in cosmetics. *Int J Toxicol* 2012;31:169S–244S.
- Munday R. Toxicity of aromatic disulphides. II. Intraerythrocytic hydrogen peroxide formation and oxidative damage by aromatic disulphides. *J Appl Toxicol* 1985;5:409–413.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する資料⑩

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

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

モノマー(いち)からデザインするバイオインターフェースと上市までの道筋

サイエンス&テクノロジー

第 1 部

医療機器市場の拡大と新規製品の開発

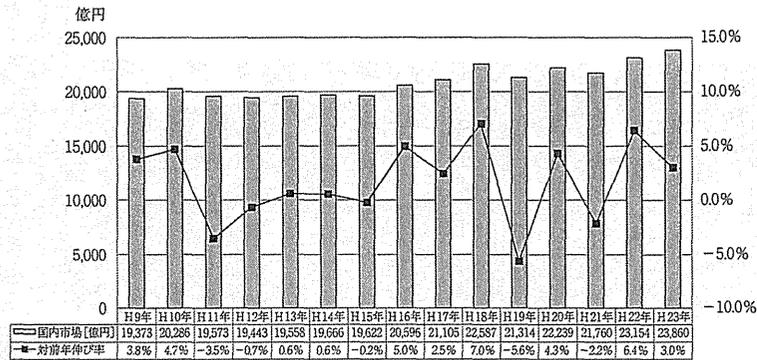
及び実用化促進を支援する施策

—開発, 上市化, 市場確保において留意すべきポイント—

はじめに

我が国の医療機器市場規模は、平成12年度から平成15年度まで横這いで推移していたが、平成16年以降増加し、平成23年は約2.4兆円となり過去最大となった(図1)。平成23年の医療機器市場において、金額ベースでは治療機器(カテーテル、ペースメーカ等)が53%、診断機器(内視鏡、CT、MRI等)が26%を占めており、一般的に治療機器の成長率が高く、市場規模も大きい(図2)。医療機器市場は景気の影響を受け難く、安定した需要がある。平成22年度における我が国の医療費は37.4兆円であり、医療機器市場はその6%強を占めている²⁾。GDPに占める医療費の割合は、現在8%から15%であるが、2050年には20%から36%(米国:36.1%、ドイツ:25.9%、日本:21.9%)と大幅な増加が予測されている。経済協力開発機構(OECD)でのデータにおいても、医療費の総額は1.9%の増加を示しており、米国を除けば、2010年ではGDP比約9%となっている。

高齢化の進展と新興国における医療需要拡大を受け、医療機器の国際市場は急成長しており、世界的競争が激化しているが、日本市場においては年々輸入が拡大しており、2010年では0.6兆円の貿易赤字となっている。貿易黒字額の多い医療機器としては、血液検査装置、採血管・輸血バッグ、透析器、医用写真フィルム、全身用X線CT装置等があり、逆に貿易赤字



出典：厚生労働省 薬事工業生産動態統計

図1 我が国の医療機器の市場規模と対前年伸び率の推移²³⁾

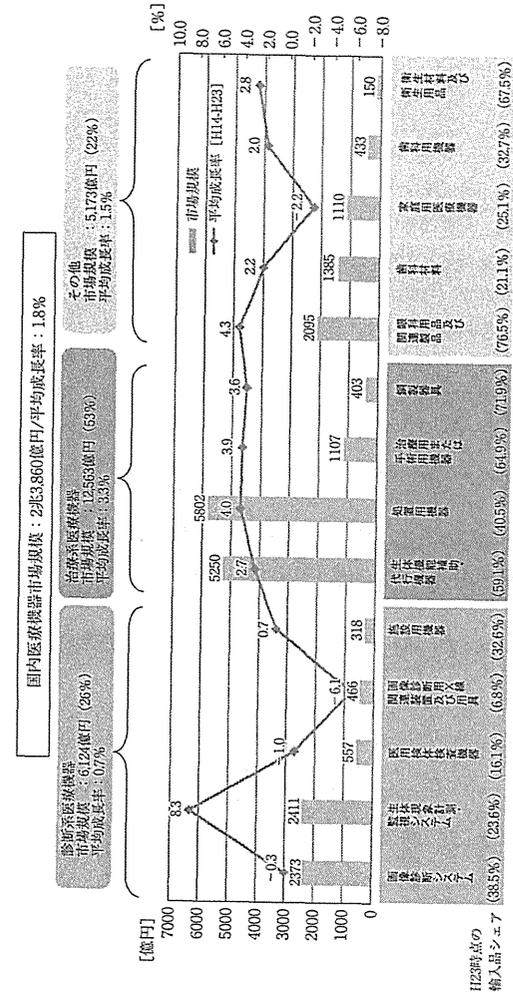


図2 日本の医療機器市場の構造²³⁾

注：国内市場規模＝国内生産額＋輸入額－輸出額 「平成23年薬事工業生産動態統計年報」をもとに作成

となっている代表的な製品として、コンタクトレンズ、人工関節・人工骨、ステント、血管用チューブ・カテーテル、縫合用器械器具等が挙げられる(表1)。

我が国のものづくり企業は医療機器に活かすことができる高い技術力を持っているが、このような貿易収支を見る限り、その力が十分に活用されていないのが現状である。これを改善するためには、医療イノベーションの推進に関する取り組みが不可欠である。世界的に医療機器開発の環境は厳しい局面を迎えており、グローバルな企業間競争に勝ち残るためには、よりイノベティブな医療機器が患者に迅速に提供されることが重要である。医療イノベーションへの期待は国内にとどまらず、世界規模のニーズでもある。

ジェトロの調査結果(米国医療機器産業の活性化に向けた政府支援策と企業の事例：2012年3月)によると、米国医療機器産業(企業数は約7000社)では、主に中小企業(従業員20名以下の会社が全体の62%)がイノベーションを実現する役割を担い、大企業は中小企業から獲得した新技術を具体的な製品に仕上げて臨床試験を行い、承認を得て世界規模の販売網で市場展開している²⁾。活発な産学連携の中にあつて、エンドユーザーである医師自身が医療機器開発に

表1 品目別の貿易収支の状況(それぞれ上位5品目)²³⁾

	品目	輸出額 (億円)	輸入額 (億円)	貿易赤字額 (億円)
1	コンタクトレンズ	1	1,413	1,412
2	人工関節、人工骨及び関連用品	5	1,158	1,153
3	ステント	16	433	417
4	血管用チューブ及びカテーテル	200	565	365
5	縫合用器械器具等	0	349	349

	品目	輸出額 (億円)	輸入額 (億円)	貿易黒字額 (億円)
1	血液検査装置等	542	4	538
2	採血管、輸血バッグ等	488	44	444
3	透析器	304	26	278
4	医用写真フィルム	226	20	206
5	全身用X線CT装置	327	137	190

〔平成23年薬事工業生産動態統計年報〕より作成

深く関与しており、我が国においても医工連携の重要性が提唱されている。米国政府は研究開発助成や税制優遇、輸出支援、承認取得の迅速化等を行っているが、医療機器開発が盛んなマサチューセッツやミネソタ、カリフォルニア等の州政府も科学研究支援、企業支援、人材育成、設備投資支援等を行っている。米国は世界最大の市場を抱え、多額の予算と人的資源、競争力を生み出す開発環境で世界をリードしている。

欧州5か国の2005年から2009年までのCAGR(年平均成長率)の伸びは、ドイツ2%、フランス4%、英国7%、イタリア3%、スペイン10%であったが、2010-2011年では大きく落ち込んでいる。欧州における2004年から2011年の医療機器の価格を見ても、平均としてMRI/5%、CT/5%、IVポンプ/8%、モニター/5%、ペースメーカー/8%、ステント/34%と下落している。また、1995年から2010年にかけての研究開発投資は8%から7%へとダウンしている。このようなことから、欧州では医療技術の真の価値を創成するための施策として、医療の変化に対するイノベーション、コストベースのイノベーション、価値を生み出すイノベーション等を真剣に考えている。

このように世界的な医療技術イノベーションの競争の中、我が国におけるイノベーションの成果を世界へ発信すると共に、医療産業を日本経済の新たなけん引役に成長させることを目指して、国際市場を占有できる高品質・高機能製品の開発と実用化促進を支援するさまざまな政策が国家戦略として推進されている。

1. 日本発の新規医療機器・医用材料の開発を支援する国家戦略

規制システムは開発及び市場アクセスの重要な要素であり、投資判断にも影響を与えている。2011年のPWCによるMedical Technology Innovation Scorecardによると、イノベーションを推進するには五つの重要な柱(財政的なインセンティブ、イノベーション・リソース、規制フレームワーク、患者の要求、投資コミュニティ)があり、いかに規制がイノベーションに対してサポーティブかどうか重要な因子の一つとなる。

医療機器開発に活用できる優れた技術が十分に活用されていない要因として、①現在の薬事法では必ずしも医療機器の特性を踏まえた規制体系になっていないため、開発に時間を要することがある、②生命や健康に直結する分野であり、参入リスクが高い、③医療現場が有する課題・ニーズがものづくり現場に行き届いていないこと等が挙げられる。このような問題は、医療現場の課題やニーズを選定後、優れたものづくり技術を有する中小企業等と医療機関等の間で医工連携体制を構築して医療機器の開発及び改良を促進すると共に、国内外の臨床評価から実用化までの一貫した取組をサポートすることにより解決されると思われる。医療イノベ

ション5か年戦略³⁾の一環として、経済産業省、厚生労働省及び文部科学省が連携して実施している課題解決型医療機器等開発事業⁴⁾や医療ニーズの高い医療機器等の早期導入に関する検討会⁵⁾等における取組は、これを具現化した施策である。この他、新規医療機器の開発を支援するためにさまざまな施策が実施されている。次に主な施策の内容を概説する。

1.1 医療イノベーション5か年戦略

平成25年度に内閣官房医療イノベーション推進室が掲げた政策である医療イノベーション5か年戦略では、基礎研究から実用化に至るプロセスにおける技術の融合として、①医工連携による橋渡し支援の整備、②医工連携の医療機器開発支援、③臨床試験の拠点整備の他、医療現場のニーズに基づく改良・改善として、④医療機器の特性を踏まえた規制のあり方の検討、承認審査として、⑤迅速に審査できる体制整備、保険適用として、⑥イノベーションの適切な評価等が挙げられている。また、新たな産業として期待されている再生医療分野においても、①長期間を要する基礎研究への支援、②再生医療の特性を踏まえた規制のあり方の検討、③迅速審査できる体制整備、④インフラ等の国際標準化の取得、⑤再生医療関連産業の振興等の主な施策が挙げられており、開発期間の短縮、より早い患者への供給のためには、⁶⁾これらの施策を確実に実行していく必要がある。

1.2 薬事法改正⁶⁾

医療機器の多くは短期間で改善・改良されると共に、そのリスク・ベネフィットバランスは使用者である医師の手技によるバイアスが入る点等について、医薬品と大きく異なる特性を持つ。平成25年度の改正を目指す薬事法では、医療機器の特性を踏まえた制度を創設するため、医療機器に関する条項を医薬品と切り離して別立てとする方向で協議されている。今回の改正では、単体プログラムの位置付け、製造販売業・製造業の許可の簡素・合理化、第三者認証機関における認証の対象拡大、QMS調査の合理化、再審査・再評価制度の見直し、運用の改善も掲げられている。また、同改正案では新たに再生医療製品の定義を置くことも検討されている。再生医療技術はリスクの程度に応じて、第一種(ES細胞、iPS細胞等)、第二種(体性幹細胞等)及び第三種(体細胞加工等)再生医療に分類される方向で議論されている。リスクの高い第一種再生医療の場合、医療機関が提供計画を作成し、特定認定再生利用等委員会の審査を受けた後、厚生労働大臣に提出して実施する。その後、一定の実施制限期間内に厚生労働大臣が厚生科学審議会の意見を聴取し、安全性等の基準に適合していないときは計画の変更を命令できる。第二種再生医療も特定認定再生利用等委員会の審査を受けるが、第一種と異なり、厚生科学審議会は関与しない。第三種については、特定認定再生利用等委員会に代わって認定再生

第1部

医療等委員会が審査を行う。再生医療規制法案は自由診療を含むヒト細胞を使用する全ての治療行為に倫理審査委員会の承認と国への届出を義務づけ、違反には治療中止命令を出すことができる内容となっている。薬事法改正案では、再生医療製品について、安全性が確認できれば、有効性が完全に証明されていない段階でも条件付きで国の承認が受けられる等、手続きを簡素化することも検討されている。

医療機器の開発や許認可等に要する時間は、平成17年度の薬事法改正や医療イノベーションの前身的施策である「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略(平成19年度)」等の成果の一つとして短縮されてきたが、今回の薬事法改正により、イノベーションを更に推進できる規制体系となることが期待される。

1.3 スーパー特区プロジェクト⁷⁾

内閣府科学技術政策・イノベーション担当部門は、革新的技術の開発を阻害している要因を克服するため、研究資金の特例や規制を担当する部局(医薬品医療機器総合機構:PMDA)との並行協議等を試行的に行う「革新的技術特区」、いわゆる「スーパー特区」を創設した。これは、従来の行政区域単位の特区でなく、テーマ重視の特区(複合体拠点の研究者をネットワークで結んだ複合体)である。平成20年度より、その第一弾として「先端医療開発特区」が創設され、最先端の再生医療、医薬品、医療機器の開発・実用化を促進している。

1.4 橋渡し研究加速ネットワークプログラム⁸⁾

アカデミア発の基礎研究成果を実際の医療に活用するための施策として文部科学省が平成19年度に創設した橋渡し研究支援推進プログラムは平成23年度をもって終了した。現在、この施策は第2期に移行し、橋渡し研究加速ネットワークプログラムとして継続されている。本施策は、画期的な医薬品・医療機器等を効率的・効果的に国民へ還元することを目指し、アカデミア発の有望な基礎研究成果の臨床研究・治験への橋渡しをさらに加速するため、全国7ヶ所に橋渡し研究支援拠点が指定され、シーズ育成能力を強化すると共に、恒久的な橋渡し研究支援拠点を確立することを目指している。

1.5 次世代医療機器評価指標作成事業/医療機器開発ガイドライン事業^{9,10)}

数年後に実用化が期待される新しい医療機器(次世代医療機器)を医療現場へ迅速に導入することを目指した事業が経済産業省と厚生労働省の連携のもとに平成17年度から開始された。本事業は国内医療機器産業の活性化に資する施策の一環として実施されており、当該医療機器の開発段階から承認審査までを見通した施策として、経済産業省側(事務局:産業技術総合研

究所)では「医療機器開発ガイドライン」, 厚生労働省側(事務局: 国立医薬品食品衛生研究所)は「次世代医療機器評価指標」を作成することにより、以前から指摘されていたデバイス・ラグを解消し、次世代医療機器をいち早く患者のもとに届けることを目的としている。本事業が対象とする製品は技術開発の進展が著しい次世代医療機器であることを勘案し、評価指標自体は将来的に起こり得る技術の革新や更なる知見の集積等によって改訂されるものであり、申請内容に対して法的な拘束力を有するものではない。また、評価指標は企業における医療機器開発の効率化や、PMDAが実施している治験相談及び薬事戦略相談等にも有効に活用されている。対象製品は異なるが、評価指標及び開発ガイドラインともに平成25年5月時点でそれぞれ19件作成されている。

1.6 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業¹¹⁾

平成24年度から開始された厚生労働省の施策である。最先端の技術を用いた革新的な医薬品・医療機器・再生医療製品については、当該技術に対応できる人材が不足しており、ドラッグ・ラグ及びデバイス・ラグ等の原因となっているが、本事業ではこれらを解消するために最先端の技術を研究している大学等において、レギュラトリーサイエンスを基盤とした安全性と有効性の評価方法の確立を図りガイドラインの作成を行うと共に、大学・研究機関等とPMDA、国立医薬品食品衛生研究所の間で人材交流を実施し、最先端の技術を習得した人材の育成を図ることを目的としている。現在、医療機器分野においては7件の課題が選定されている。

1.7 薬事戦略相談¹²⁾

大学、研究機関またはベンチャー企業等において有望なシーズが発見されたとしても、当事者が製品化につなげるための開発戦略に精通していなければ、そのシーズを活かすことは難しい。この問題を解決する一助として、PMDAは日本発の革新的医療機器の創出に向けて、設計初期段階から臨床開発初期に至るまでに必要な試験等についてデータの評価を伴う案件や治験計画策定等に関する相談への指導・助言を行っている。利用者のニーズに合わせて個別面談、事前面談または対面助言が準備されている。個別面談では、希望する相談内容の薬事戦略相談への適否や薬事戦略相談事業の内容や手続きを確認することができる。対面助言では、相談者から提出された資料を担当審査部の審査チームが精査し、今後実施する治験や承認申請に向けた具体的な助言・指導を公式見解として得ることができる。事前面談では効率的な対面助言に向けて、相談内容、論点整理、資料内容の確認を行う。

2. 医療機器審査の視点と保険取載

2.1 基本的事項¹³⁻¹⁵⁾

薬事法第2条第4項において、医療機器とは「人若しくは動物の疾病の診断、治療若しくは予防に使用されること、又は人若しくは動物の身体の構造若しくは機能に影響を及ぼすことが目的とされている機械器具等であつて、政令で定めるものをいう」とされている。医療機器の製造販売をしようとする者は、品目ごとに厚生労働大臣の承認(一般医療機器、指定管理医療機器を除く)を受けなければならない(薬事法第14条第1項)。また、薬事法第14条第1項の承認を受けようとする者は、厚生労働大臣の定める基準に従って収集且つ作成された臨床試験の試験成績に関する資料及びその他の資料を申請書に添付しなければならない(薬事法第14条第3項)。医療機器の承認は、薬事法第14条第2項(承認拒否事由)に該当しないとき、換言すれば申請に係る「効能、効果又は性能」が認められ、その「効能、効果又は性能」に比べて「著しく有害な作用」を有していないときに与えられる。すなわち、医療機器の承認審査では、リスク・ベネフィットのバランスを勘案して有効性及び安全性を評価すると共に、使用目的または効能・効果、操作方法または使用方法、使用上の注意が妥当であることを判断する。医療機器は不具合発生時の人体に対するリスクの程度により、クラスⅠ(一般医療機器)、クラスⅡ(管理医療機器)、クラスⅢ及びⅣ(高度管理医療機器)に分類されている。基本的にクラスⅢ以上の医療機器の薬事審査はPMDAが担当し、大臣承認を受ける。クラスⅡ及び一部のクラスⅢ医療機器の審査は第三者認証機関によって行われる。不具合が生じた場合でも人体へのリスクが極めて低いと考えられるクラスⅠ医療機器の製造販売は届出制である。

医療機器には多様な製品があり、技術革新周期も早く、その改良は市販後も続くため医薬品と異なり画一的な評価は困難である。審査は事例毎に承認と不承認を判断することが基本であり、適切な判断のもと、回り道をせずに早く行うことが理想的である。

2.2 非臨床試験

審査における非臨床試験のデータパッケージとして、仕様の設定に関する資料が要求される。具体的には、安定性及び耐久性に関する資料、薬事法第41条第3項に規定する基準(厚生労働省告示第122号/医療機器基準)への適合性に関する資料、安全性(物理・化学的特性、電気的安全性及び電磁両立性、生物学的安全性、放射線に関する安全性、機械的安全性、無菌性)、性能、効能、使用方法を裏付ける資料等が求められる。安全性については、一般的要求事項としてJIS T 0601-1(電気的安全性及び電磁両立性)、JIS T 0993-1(生物学的安全性)、JIS B 9700-1(機械的安全性)、「薬事法及び採血及び供血あっせん業取締法の一部を改正する法律

の施行に伴う医薬品、医療機器等の製造管理及び品質管理(GMP/QMS)に係る省令及び告示の制定及び改廃について：第4章第4 滅菌バリデーション基準(薬食監麻発第0330001号：平成17年3月30日)〔(無菌性)等の他、JIS Q 13485(品質マネジメント)及びJIS T 14971(リスクマネジメント)に適合することが求められる。その他、各医療機器固有の安全性を担保するための資料が必要であると共に、薬事法改正後、プログラムまたはプログラムを有する医療機器については単体及び装置組み込み型の別を問わず、IEC 62304やIEC 82304-1等のプログラムに関する規格に適合することが求められる。性能に関する評価項目は個々の製品により異なる。例えば、コンピュータ支援手術装置の場合は可動部分(可動原理、制御方法、動作精度、精度の妥当性、動作距離・速度・出力、空間的配置)、医療処置部分(原理、制御方法、動作精度・妥当性、処置範囲、レーザー等出力、外乱要因対応策)、レジストレーション機能(空間情報の把握方法・妥当性、空間的精度、時間的精度、再現性、バリデーション方法)、安全機構(アラーム、緊急停止対策、緊急停止条件、誤作動予防対策等)等が挙げられる。動物試験を行う必要性が認められた場合は、動物の種類とヒトへの外挿性や動物の手術方法と臨床における手術方法との相関性を考察すると共に、取得する計測データ(生理学的、機械的及び電気データ等)、例数の設定とその妥当性等を詳細に検討したプロトコルを作成する。また、評価にあたって考慮すべき点としては、処置の達成状況、システムの性能に係る設計仕様の満足度、治療状況、生体に対する有害事象の程度と頻度等が挙げられる。

医療機器及び原材料の生物学的安全性評価¹⁶⁾では、JIS T 14971「医療機器－リスクマネジメントの医療機器への適用」に示されたリスク分析手法に基づき、意図する使用または意図する目的及び医療機器の安全性に関する特質を明確化し、既知または予見できるハザードを特定し、各ハザードのリスクを推定する必要がある。本アプローチにおける陽性結果はハザードが検出・特定できたことを意味するものであり、それが直ちに医療機器としての不適を意味するものではない。医療機器の生物学的安全性は引き続き行われるリスク解析により評価される。個々の医療機器の生物学的安全性について評価すべき試験項目の選択は基本的にJIS T 0993-1(またはISO 10993-1)に準じて判断する。同JISに規定されている試験項目は、細胞毒性試験、感作性試験、刺激性/皮内反応試験、急性全身毒性試験、亜急性全身毒性試験、遺伝毒性試験、発熱性試験、埋植試験及び血液適合性試験である。これらの試験は実施すべき評価を網羅したのではなく、適切にリスク評価を行う際に考慮すべき項目であるが、人体との接触部位と使用期間を考慮した上で複数の試験を組み合わせる評価することが基本となる。この他、特定の医療機器については、慢性毒性、発がん性、生殖/発生毒性、生体内分解性等に関する評価を実施する必要がある。急性全身毒性、亜急性全身毒性または慢性全身毒性試験において、埋植試験あるいは使用模擬試験が各毒性試験で必要とされる観察項目及び生化学データ等を含んで

いる場合は、これらの毒性試験に代えることができる。埋植医療機器のリスク評価では全身的影響及び局所的影響を考慮しなくてはならない。接触部位が常常皮膚である医療機器や生物学的ハザードが特定されている医療機器の場合は既存製品との同毒性評価や文献等による評価により試験を代替することも可能である。直接または間接的を問わず、生体と接触しない医療機器は生物学的安全性を評価する必要がある。

非臨床試験において検出されたハザードからリスクを推定し、リスク・ベネフィット評価を行うことにより臨床試験に移行する妥当性を判断する。非臨床試験から得られた情報により、臨床試験において示すべき内容が決まる場合があると共に、非臨床試験でハザードが十分に検出され、リスクが推定されれば、臨床試験において観察すべき項目が決まるため、非臨床試験は臨床試験のデザインを考える上で重要な位置を占める。また、非臨床試験は有効性及び不具合・有害事象を考察する土台となるため、臨床試験結果を解析する際にも有用である。非臨床及び臨床試験結果で確認が不十分な部分を明確化し、市販後臨床試験のデザインに反映させることも可能である。

2.3 臨床試験(治験)

治験の要否は、平成20年8月4日付け薬食機発第0804001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「医療機器に関する臨床試験データの必要な範囲等について」¹⁷⁾に基づいて判断する。すなわち、医療機器の臨床的な有効性及び安全性が性能試験、動物試験等の非臨床試験成績または既存の文献等のみによっては評価できない場合に臨床試験(治験)の実施が必要となり、臨床試験成績に関する資料の提出が求められる。また、その使用目的、手術手技、性能、構造等が既存の医療機器と明らかに異なる場合については、原則として臨床試験の試験成績に関する資料の提出が必要である。

医薬品と異なり、医療機器の臨床試験は画一的な手法では実施できない。臨床試験を実施する場合の症例数は、その目的や主要評価項目等を踏まえ、科学的根拠に基づき、当該医療機器の有効性、安全性の評価に適切な症例数とする。希少疾病用医療機器等、適応疾患の症例自体が少ない場合は当該事情を勘案して妥当な治験計画を立案し、評価可能且つ実施可能な症例数を設定する。既存製品との比較等、比較対照をおく場合にあっては統計学的に症例数を設定する必要があることに留意する。また、信頼できる海外データを承認申請の添付資料として使用できることがあるが、そのみで臨床評価を行うことができるかどうかについては十分に検討する必要がある。

臨床試験計画の立案にあたっては、目的を勘案し、First-in-Human、探索的治験、検証的治験、既存治療との比較、全く新しい治療法の検証等を考慮した上で、方法、対照群、盲検性、対象

患者の選択、主要評価項目、副次評価項目、目標症例数(設定根拠を含む)、観察期間等について検討することが基本となる。通常、既存の医療機器と比較して有効性及び安全性が同等以上であることの評価が必要であり、既存製品と同様に目的とする治療が実施できることはもちろんのこと、既存製品に比して、非劣性であることを具体的な項目を挙げて示す必要がある。

2.4 保険収載¹⁸⁾

自社が開発した医療機器が保険収載されるか否かは、企業が事業を展開する上で重要な案件となる。医療機器の承認審査はPMDA、認証審査は第三者認証機関が実施するが、医療機器の保険償還は厚生労働省医政局経済課が担当している。保険償還に係る医療機器の評価区分はA1(包括)、A2(特定包括)、B(個別評価：特定保険医療材料)、C1(新機能)、C2(新機能・新技術)及びF(保険適用に馴染まないもの)に分類される。A1は、いずれかの診療報酬項目において包括的に評価されているもの(例：縫合糸、静脈採血用注射針等)であり、A2は特定の診療報酬項目において包括的に評価されているものであり、眼内レンズと水晶体再建術、超音波検査装置と超音波検査等が該当する。Bは材料価格が機能別分類に従って設定され、技術料とは別に評価されているものであり、例としてPTCAカテーテル、冠動脈ステント、ペースメーカ等が挙げられる。C1は新たな機能区分が必要で、それをを用いる技術は既に評価されているものである(例：特殊加工を施した人工関節等)。C2は新たな機能区分が必要で、それをを用いる技術が評価されていないものであり、カプセル内視鏡等が該当する。

医療機器・材料価格は承認または認証済み医療機器に係る保険適用希望書を提出し、A1、A2及びB区分については中医協に報告後、C1及びC2については保険医療材料専門組織の審議を経て中医協の了承を得た後に算定される。保険収載にあたり、高い安全性及び有効性を有する医療機器には保険点数が加算される。①臨床上有用な新規の機序を有し、②類似機能区分に属する既収載品に比較して高い有効性または安全性を有することが客観的に示されていると共に、③当該新規収載品により対象となる疾病または負傷の治療方法の改善が客観的に示されている医療機器については画期性加算(50-100%)が適用される。画期性加算条件3項目中、いずれか一つを満たす場合は有用性加算(5-30%)が適用される。その他、加算要件の見直しにより、イノベーションを評価する改良加算(3-10%)も存在する。改良加算は既収載品と比較して、職業感染リスクの低減、廃棄後の環境リスクの低減、低侵襲治療の提供と合併症発生頻度の低減、小型化・軽量化、使用方法の簡易化、耐久性の向上、在宅療養の質的向上が客観的に示されている医療機器に適用されるものであり、画期性加算及び有用性加算の対象となる製品は除外される。

3. 医療機器開発における留意点

医療機器を円滑に製品化・臨床導入するためには、開発初期あるいは設計の段階から、薬事申請、上市及び市販後安全対策について検討すべきである。製造所として必要な製造販売業等の業の取得、製造に対するQMS、製品開発や薬事申請に必要な安全性や性能に関する非臨床及び臨床試験の内容、治験の要否等を可能な限り早期に検討することにより、効率的に目標が達成できる。

3.1 材料選択

医療機器の開発にあたっては、材料選択の段階から安全性を視野に入れて研究を進めるべきである。医療機器を構成する代表的な材料としては、金属、合成高分子、セラミック、生体由来を含む天然由来材料等が挙げられるが、金属材料については金属アレルギー、天然由来材料では微生物汚染の問題等を常に考慮する必要がある。合成高分子材料の生物学的安全性は同材料から溶出する化学物質の毒性により大きな影響を受けるため、直接または間接的接触を問わず、生体に適用する医療機器を開発する場合は可能な限り無毒性の原材料を使用することが望ましい。医療機器に要求される特性を充足するため、毒性を発現する可能性のある化学物質(触媒、色素、架橋剤、生理活性物質等)を使用する必要がある場合は、該当する化学物質を除去または固定化する等のステップを製造工程に組み込むことが理想的である。残存した毒性物質が溶出する可能性がある場合は、実臨床を模した条件下において溶出実験を行い、当該物質の暴露量と毒性強度に基づいたリスク解析を実施することにより、最終製品の生物学的安全性を担保する必要がある。

医用材料の生体適合性は、上記のとおり種々の溶出物や残留物質等の毒性や微生物汚染に由来する感染因子の他、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。血液適合性材料として、超親水性表面、マイクロ相分離表面、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きたが、近年、材料表面の水の状態が血液適合性(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他、中間水を持つことが確認されている^{19,20)}。中間水の存在の有無や材料表面への蛋白質吸着挙動から材料の生体適合性や機能を予測できる可能性が非常に高く、これらのパラメータは材料選択のよい指標となり得る。

自社開発品を除き、通常、医療機器を構成するまたは医療機器に含有される原材料は原材料製造会社から購入する。医療用グレードの原材料を供給しているメーカーも存在するが、一般用と医療用を区別していないメーカーもある。いずれの場合においても、原材料は医療機器の安全性と有効性を確保する観点から、生体への接触部位と使用時間、性能への影響の程度、原材料の性状・特徴を考慮して適切に特定することが求められる²¹⁾。間接的または直接的を問わず、血液・体液・粘膜等に接触せず、医療機器の性能自体に大きな影響を及ぼさない原材料については一般名または通称等の簡潔な記載で構わない。埋植または30日を超えて長期的に血液・体液・粘膜等と接触することが想定される部位に使用される原材料の他、コンタクトレンズや眼内レンズ等のように原材料の成分・分量の些細な相違が最終製品の有効性に影響する原材料の場合については、原則として実際に製造に供される原材料を適切に特定する必要がある。これら以外の一時的接触または短・中期的接触の原材料については、最終製品の品質、安全性、有効性を確保するために必要な範囲で特定する。原材料の特定は、原則、実際の製造現場において識別し、原材料製造会社から提供される情報を利用して行う。一般名または通称もしくは細分化された名称で特定する場合以外では、原材料の化学的・物理的情報、製造業者名と製品名または製造番号、CAS等の公的規格が存在する場合はその規格番号により規定する方法がある。原材料製造会社からの情報は非常に重要であり、成分・組成を含めて可能な限り多くの情報開示を得ることが肝要である。

3.2 薬事法に準拠した開発

クラスII以上の医療機器を上市化する場合は薬事法に基づいた承認・認証審査を受ける必要がある。当然、その審査も薬事法に準拠して行われるため、医療機器の開発も初期段階から薬事法を理解した上で進めることが重要である。安全性を無視または軽視し、有効性確保に偏った開発は研究の域を出ないことが多い。品質・性能、安全性及び有効性を評価するための規格・基準や試験法も薬事申請を視野に入れて選択する必要がある。特に試験法の設定は重要であり、研究レベルでは妥当と思われる方法により良好な成績が得られていたとしても、薬事申請を行うにあたり多くのデータを取り直す必要がある場合は、時間及び経費の浪費に直結すると共に、再取得したデータによってはリスク・ベネフィットバランスが崩れる可能性を含んで

いるため、連携企業が見つからないケースが多い。また、新しい医療機器の場合、該当する規格・基準はもちろん、試験法も存在しないことがあるが、このような場合は開発者自らが試験法を考案する必要がある。

医療機器の開発から上市化に至る一連の過程には、医療現場のニーズと確実なシーズ、開発のための多大な時間と経費の他、薬事に関する豊富な知識と経験が要求される。ニーズが高く有益と思われるシーズであっても、医師または研究者が単独で開発を進め、上市化に結び付けることは不可能に近い。この一連の過程においては、医工連携はもちろんのこと、その他にも品質マネジメントや申請方法等を熟知した薬事専門家、試験法開発等に精通するレギュラトリーサイエンティスト、市場展開するための企業等、各領域を得意とするさまざまな人材の協力を得ることが重要である。開発者個人が薬事やレギュラトリーサイエンスの専門家を確保できない場合は、設計へのインプット、設計プロセス、設計のアウトプットの各段階においてPMDAの戦略相談窓口を利用することが目標達成への近道となる。その他、製品の開発から実用化までを総合的にサポートする橋渡し研究を業として提供する公益財団法人等に協力を求めることも有益な選択肢の一つである。なお、企業が興味を示さない新規医療機器の開発には、設計コンセプト、医療機器としてのリスク・ベネフィットバランス、開発に要する時間及びコストのパフォーマンス、市販後の収益性やPL法等のいずれかに問題点が必ず存在するため、考えられる全ての要因について考察する必要がある。

医療機器を上市化するにあたり、薬事法を避けて通ることは不可能である。換言すれば、薬事法を理解し、同法に従った開発を展開しない限り、新たな製品を市場に出すことはできない。薬事申請に必要な情報は全て開示されている。医療機器開発を真剣に目指すのであれば、努力を惜しまず邁進する気構えが必須となる。

4. 市場拡大に関する国際標準化の重要性²²⁾

近年、世界中で経済のグローバル化が急速に進み、経済活動を妨げる国境の壁が低くなり市場が世界単一化していく中で、製品の性能が優秀でも国際標準から乖離した仕様では市場に受け入れられなくなってきている。これは世界貿易機構(WTO)が、貿易障害協定(TBT協定)で加盟国に対して非関税障壁を排除する目的で国際規格に準拠した製品づくりを要求していることから見ても明らかである。この観点より、グローバル化した世界市場においては「規格を制するものが市場を制する」といっても過言ではない。しかし、日本企業の国際標準化に関する認識は高いとはいえない。この原因は、従来の日本のものづくりの基本方針である「良いものを適正な価格で市場に送り出し、市場を制する」ことで製品を標準化するというデファクト

標準重視の姿勢が世界の動向に合わなくなってきた状況を企業経営陣が理解していない点にある。米国でも従来のデファクト標準重視の方針からデジュール標準重視に大きく舵を切っている。欧州諸国は古くから国際標準化を重視しており、近年では中国、韓国、ブラジル等の国々も ISO/IEC に積極的に参画している。

標準化は製品の差別化を困難にし、コスト競争に陥る危険性を持っている。したがって、標準化で市場を拡大しながら収益を確保するためには、事業戦略を明確にした上で、作りたい標準を自ら提案し、不都合な標準の作成は阻止するという積極的な取り組みが必要である。また、標準化とは、製品仕様^{仕様}の決定にあたって、何を競争領域とし、何処を協調領域とするかの線引きであるともいえる。このため、グローバル市場においては線引きでイニシアティブを取ったものが市場競争で優位に立つ可能性がある。しかし、線引きを誤れば、技術を固定化してその後の技術開発の妨げになり、更には市場に受け入れられない標準になる。標準化とビジネスは密接に結び付いており、競争領域においてはいかにして市場競争を勝ち抜くかという開発戦略と直結している。また、開発戦略の立案にあたって、技術開発と商品開発のどちらを優先するかを市場のフェーズ^{フェーズ}(^{萌芽期}、^{成長期}、^{成熟期})や市場ニーズの観点から見極める必要があり、事業戦略、開発戦略及び標準化戦略は一体となって進めるべきものである。

我が国の優れた製品を世界的に流通させるためには、日本の国内法規における要求事項を反映した国際規格を作成し、運用することが最適といえる。また、日本は医療機器開発において先進的な技術力を持つことから、国際的な優位性を確立することが可能な状況にある。例えば、製品や材料の性能評価等に関する技術については、差別化による高付加価値化を狙い、新たな市場を開拓していくことが重要である。このため、研究開発段階から標準化を視野に入れたプロジェクトを推進すると共に、国際標準策定に必要なデータ取得、ラウンドロビンテスト等を産業界と一体となり推進することが必要である。

品質マネジメントにおける製品実現の設計開発では、設計へのインプット、設計プロセス、設計のアウトプットが重要な点である。通常、設計・開発者は当該機器に要求される基準・規格を選択して設計するが、それは国際標準を含み State-of-the-Art(最新の技術)のものでなければならない。しかし、新しい機器の設計開発においては、設計・開発者が最新の基準・規格を把握していないケースが見受けられる。また、State-of-the-Artの基準・規格自体が存在しないことも多いが、この場合、設計・開発者が自らこれを作り出さなければならない。これが特許となり、将来、国際標準として公開するかまたは公開せずにブラックボックスとするかの判断が企業戦略となる。次に国内規格・基準の現状及び標準化戦略と知財戦略の相関性について概説する。

4.1 国内規格・基準

医療分野の国際規格は、ISO/846件、IEC/191件、合計1037件である。一方、医療分野の日本工業規格(JIS)は459件であり、国際規格に対応しているものは276件である。JISは国際規格をベースに作成されているものが30%弱であり、決して国際性が高いといえないのが現状である。また、これらのJISのうち、約半数が薬事法、計量法等で使われていることが特徴である。

一般的に、JIS規格の作成は関連業界が担当しているが、国際規格が発行されてから当該翻訳JISが発行されるまでには大変長い時間を要しており、電子情報技術産業協会(JEITA)のデータによると5年から10年の遅れが見受けられる。このようにJIS化における課題としては、国際規格がJIS化されていないことや、JIS化に時間を要し、タイムリーではないこと等が挙げられる。これらの問題は明らかに日本企業の国際競争力を失わせることになり、輸出拡大の大きなブレーキになると思われる。

医療イノベーション5か年戦略によると医療機器に関する国際標準化の推進等に関して次のように言及している。

- (1) 日本発の医療材料や診断・治療装置の規格化及び評価方法等の標準化に加え、それらに用いる主要部材に関する信頼性や耐久性等の基準設定を国が主導して一体的に進める等、戦略的に国際標準化を進める。
- (2) 今後、世界的な成長が期待され、我が国が優れた技術を有する分野(特定戦略分野)の一つとして先端医療機器を対象に、国際競争力強化のため国際標準の獲得を推進する。
- (3) 国内のQMS基準(医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準)とISO 13485との一層の整合性を図るとともに、製品群毎の調査方法の導入等、QMS調査の効率化と質の向上を図る。

また、審査基準の明確化の項では、「(2)世界に通用する革新的医薬品・医療機器の開発に資するよう、レギュラトリサイエンス研究の成果を活用し、国際的に整合性のとれた革新的医薬品・医療機器の審査のガイドラインを整備する。また、審査の国際的ハーモナイゼーションを推進すると共に、日米欧等の審査当局が審査や相談、GCP実地調査等に関する協議に向けた意見交換を引き続き実施する。特に医療機器について、日米欧等の審査当局間におけるHBD(Harmonization by doing)等を通じて、日米欧等との同時開発を推進する」とされている。さらに医療機器の特性を踏まえた規制のあり方の検討の項における②第三者認証機関が行う認証基準については、「最新の国際的な基準とも整合性が図られるよう、JIS規格だけでなく、国

際的な基準を採用し、認証制度の合理化を進める」としている。これらの考えに基づき国際標準化を進め、国際規格を積極的に使っていく必要がある。

4.2 標準化戦略と知財戦略

1995年にWTO/TBT協定が成立し、任意規格/強制規格ともに国内規格を国際規格に適合することが求められるようになった。さらに1996年にWTO政府調達協定が成立して、政府調達は国際規格に適合することが義務化されたことにより、国際標準化の重要性は益々高まっている。

標準化戦略と知財戦略は企業における有力な事業戦略であるにも関わらず、各々独立した手段であると考えられてきた。標準化は技術を普及させる手段としてとらえられる一方、知的財産権の活用は技術の独占によって自社の競争力を高める手段としてとらえられており、外見上、両者は目的を異にするものであるからである。

しかしながら、近年、特許技術が標準に必須の要素として含まれる例が増えてきた。また、欧米を中心として、標準の必須特許(規格特許)に関する数々の知財係争が起こったことから、標準と特許はもはや独立した手段ではなく、両者を組み合わせた戦略が有力なビジネスツールになると考えられるようになってきた。標準化戦略と知財マネジメントを連携し、知財戦略・標準化戦略と研究開発戦略・事業戦略を一体として考えることは、企業利益を獲得するための一手段として重要となっている。

標準化に関する政策を考えるためには、企業が所持する知的財産をどのように取り扱うかに関する意思決定問題を考える必要がある。企業が知的財産を取り扱う場合、基本的には知的財産を①公開するか、②権利化するか、③秘匿するかという三つの選択肢が存在する。これらの選択肢にはそれぞれ固有のメリットとデメリットが存在するため、標準化を踏まえた上で知的財産マネジメント戦略を企画・立案することが重要である。

おわりに

近年、我が国において、次世代型補助人工心臓や細胞シート工学製品等、世界をリードする製品が開発されたが、日本発の新規医療機器を世界に先駆けて上市化することを目指した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」の施策中であつたにも拘わらず、両製品の治験は海外に流出した。現在も医療イノベーション5か年戦略をはじめとしたさまざまな施策により日本発の革新的医療機器の開発が推進されているが、上市化に成功した事例は決して多くなく、依然として海外製品が国内市場の大部分を占めているのが現状である。その要因を解析

第1部

し、アカデミア及び関連企業における医療機器開発を促進するための現実的な方策を真剣に考える時期が到来していると思われる。

我が国の医療機器産業を活性化するために必要な因子は幾つか存在するが、中でも薬事法改正、医工連携、橋渡し研究及び国際標準化が大きなカギになると考えられる。薬事法は医療機器の特性を踏まえた制度に改正されるが、改正薬事法を活かすためには政令、省令、通知の整備等を通じて、一層の医療機器審査の充実と合理化を図っていく必要がある。また、新規医療機器の安全性と有効性を評価するためには市販後調査が極めて重要であり、その結果を含めて検討する必要性が求められる場合があることから、市販後臨床試験の導入を積極的に推進することを要望するアカデミアや企業は少なくない。医工連携の重要性は少なくとも40年前に提唱された。現在ではさまざまな大学や研究機関が医工連携拠点を構築し、医療機器開発を加速させている。橋渡し研究については、その重要性が提唱されてから早10年程度が経過し、近年、ようやく本格的に始動できる体制が整ってきている。

日本発または日本の主張を国際規格に取り入れていくことは、中・長期的にも「ものづくり国家・日本」の重要な課題である。我が国の医療機器分野における国際標準化活動を活性化させるために必要な因子は多岐にわたる。実質的な国際活動は関係工業会等に依存しているケースが多く、専門性を持つ企業が加盟する工業会等に依頼されることは当然であるが、国としてそれを総括し、積極的に支援する体制を構築することが求められている。しかし、国際規格策定業務に携わる人材(エキスパート)を抱える企業経営陣に国際標準化活動の理解がなければ、満足できる結論を得ることは不可能である。国際規格策定業務には多くの時間と費用がかかるが、エキスパートの評価が適切に行われない場合、モチベーションの向上につながらず、意欲的な活動を期待できない。我が国において国際標準化活動に携わるエキスパートの1企業あたりの人数は韓国や中国を含む諸外国と比較して極端に少ないのが現状であるが、人材の確保と育成に係る問題も企業経営陣の考え次第で改善できる。デファクト標準からデジュール標準への移行は世界的な流れであるため、医療機器産業界、特に企業経営陣に向けて国際標準化の重要性を啓蒙することは、国としての緊急の課題である。

参考文献

- 1) 日本分析機器工業会 HP http://www.jasis.jp/2013/pdf/result/130905_04_kakudo.pdf (2013.11).
- 2) 日本貿易振興機構 HP http://www.jetro.go.jp/jfile/report/07000902/us_medical_enhancement.pdf (2013.11).
- 3) 首相官邸 HP <http://www.kantei.go.jp/jp/singi/iryou/5senryaku/> (2013.11).
- 4) 経済産業省 HP <http://www.meti.go.jp/information/publicoffer/kobo/k130329001.html> (2013.11).

- 5) 厚生労働省 HP <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000ax9a.html#shingi128705> (2013.11).
- 6) 厚生労働省 HP <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r985200000020uxm-att/2r985200000020uz3.pdf> (2013.11).
- 7) 内閣府 HP <http://www8.cao.go.jp/cstp/project/tokku/> (2013.11).
- 8) 橋渡し研究加速ネットワークプログラム HP <http://www.tr.mext.go.jp> (2013.11).
- 9) 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部 HP <http://dmd.nibs.go.jp/jisedai/index.html> (2013.11).
- 10) 経済産業省 HP http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryoku_fukushi/ (2013.11).
- 11) 厚生労働省 HP http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/iryokuhin/kakushin/index.html (2013.11).
- 12) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/consult/yakujisenryaku/file/yakujisenryaku-youkou.pdf> (2013.11).
- 13) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/guide/kagakuinkai/iyaku/h240924gijishidai/file/shiryoo9-3.pdf> (2013.11).
- 14) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iryokiki/file/iryokiki.pdf> (2013.11).
- 15) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iryokiki/iryokiki-list.html> (2013.11).
- 16) 医薬品医療機器総合機構 HP http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/saisei-iryoku/pdf/H240301_030120.pdf (2013.11).
- 17) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/notice/2008/file/0804001.pdf> (2013.11).
- 18) 厚生労働省 HP <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/hoken/iryokiki/> (2013.11).
- 19) 科学技術振興機構 HP <http://jstshingi.jp/abst/p/10/1005/yamagata1.pdf> (2013.11).
- 20) 名古屋大学エクトピア科学研究所 HP http://www.esi.nagoya-u.ac.jp/shinpo/poster_20120718.pdf (2013.11).
- 21) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iryokiki/file/iryokiki-material.pdf> (2013.11).
- 22) 厚生労働科学研究成果データベース HP <http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD02.do?resrchNum=201203003A> (2013.11).
- 23) (一社)日本分析機器工業会 HP, JASIS2013メディカルイノベーションゾーンテーマ講演要旨(講演者 経済産業省 商務情報政策局 覺道 崇文医療・福祉機器産業室長).

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する資料⑪

バイオマテリアル-生体材料, 33(1):56-63 (2015)