

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 齋島 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なうことにより、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、ESBO 8 パーツ、ステアリン酸カルシウム及びステアリン酸亜鉛 0.05 パーツのほか、1.0 及び 1.5 パーツの Genapol X-080 を含有する 2 種類の可塑化 PVC パウダーを調製した。Genapol X-080 含有 PVC シート（Y-2 及び Y-3 : 厚さ 0.4 mm）は同パウダーを利用してヒートプレス法（180℃）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

訓化した5週齢のSD系雄ラット(8匹/群)にDEHP(5000ppm)及び種々の量のDOTH(0,5,50,500,5000ppm)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(16mmSST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片、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(4.5mL)中で細切し、37%ホルマリンを0.5mL加えて固定化した。同溶液10 μ Lに20 μ MHoechst33258含有PBS(90 μ L)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:Ex360nm/Em460nm)。

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EndocrineTechnologies社製キット、エストラジオールE2はEnzoLifeSciences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16ntのPolyA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、BIAcore2000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. Genapoli X-080 含有 PVC シートの性能評価

Genapoli 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、Genapoli 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/直接接種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/直接接種法及び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。直接接種法による検出感度は抽出液法と比較して低く、ASTM/直接接種法及びNIH/直接接種法における溶血率（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では 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、Mg²⁺ 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 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 の場合には 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) 藪島由二．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，藪島由二，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，藪島由二．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，藪島由二．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) 藪島由二，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) 藪島由二，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，藪島由二，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) 藪島由二，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，藪島由二．溶血性試験用陽性対照材料 GenapoI 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：藪島由二，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．