

【本文で使用された略号】

ATRP: Atom transfer radical polymerization  
MPC: 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine  
CBMA: *N*-methacryloyloxyethyl *N,N*-dimethyl ammonium- $\alpha$ -*N*-methyl carboxylate  
SBMA: [2-(methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide  
mOEGMA: Oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate  
TMAEMA: 2-trimethylammoniummethyl methacrylate  
BMA: *n*-butyl methacrylate  
DLC: Diamond-like carbon  
PEOVE: Poly (2-ethoxy- ethyl vinyl ether)  
PTHFVE: Poly (tetrahydrofurfuryl vinyl ether)  
PMe3A: Poly [2-{2-(2-methoxy-ethoxy) ethoxy} ethyl acrylate-co-butyl acrylate]  
Alb: albumin  
Lys: Lysozyme (ニワトリ卵白由来)  
AFM: Atomic Force Microscopy  
PMEA : Poly(2-methoxyethyl acrylate)  
PHEMA : Poly(hydroxyl-ethyl methacrylate)  
MEA : 2-methoxyethyl acrylate  
HEMA : Hydroxyl-ethyl methacrylate)  
FIB: Fibrinogen  
FINC: Fibronectin  
VTNC: Vitronectin  
PMEM: Poly(2-methoxyethyl metacrylate)  
QCM: Quartz Crystal Microbalance  
PP: Polypropylene  
PC: Polycarbonate  
PET: Polyethylene terephthalate  
 $\beta$ -TG:  $\beta$ -Thromboglobulin  
TAT: Thrombin-Antithrombin Complex  
ROMP: Ring opening metathesis polymerization  
DSC: Differential scanning calorimetry  
HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells  
IL-8: Interleukin 8  
IPA: Ingenuity pathways analysis  
TCPS: Tissue culture-treated polystyrene

革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究

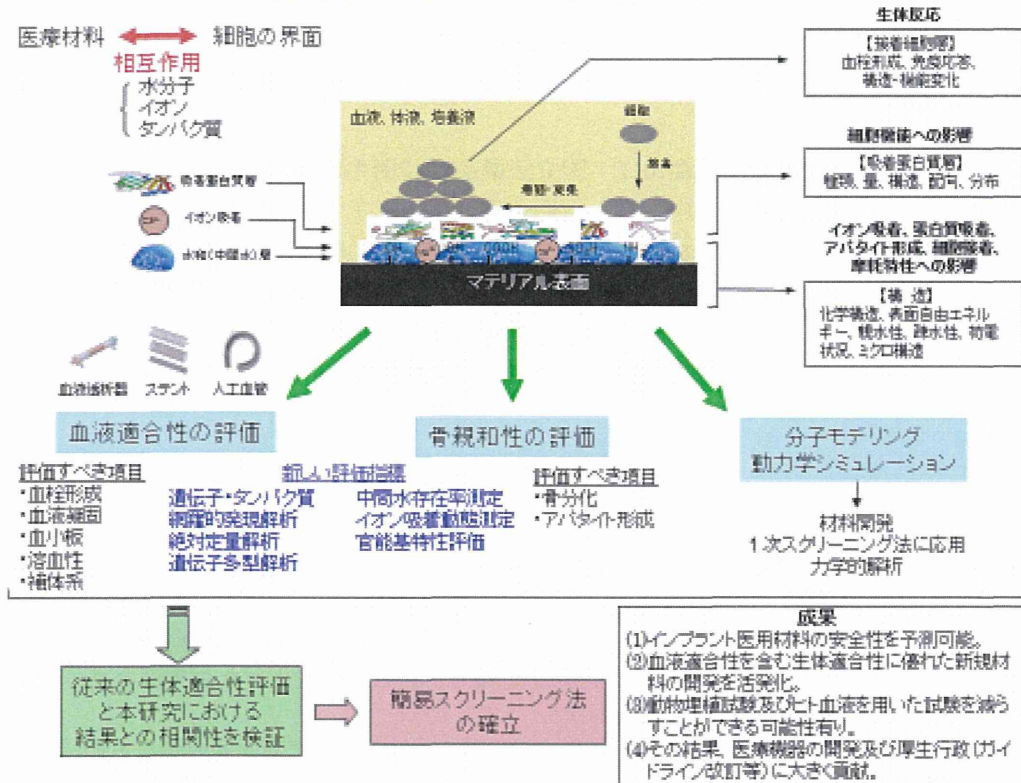


図1 革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究

分担研究報告書  
厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名  
プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究

研究分担者 靛島由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
研究協力者 田中 賢 山形大学大学院理工学研究科  
野村祐介 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
福井千恵 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
比留間瞳 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
柚場俊康 川澄化学工業株式会社

## 研究要旨

平成 26 年度の本研究では、材料/細胞界面特性に着目した新たな血液適合性試験法の有用性を検証する一環として、金属ステント材料の血液適合性を我々が選定した血液適合性評価マーカ蛋白質の吸着特性から検討し、得られた成績を過去に報告された *in vitro* 及び *in vivo* 試験結果と比較検討した。また、新規材料開発支援ツールとしての応用を目指し、新たに合成された生体適合高分子材料の血液適合性を蛋白質吸着挙動から予測・評価した。

血管ステントの新たな金属材料である SUS/30%F/DLC に対する血液凝固関連蛋白質の吸着は SUS 及び Co-Cr と比較して顕著に抑制されており、ヒト血液を用いた *in vitro* 血小板吸着試験やミニプタを使用した *in vivo* 再狭窄評価試験と一致する成績が得られた。本研究において予測された SUS/DLC 及び中間層にケイ素を導入した SUS/Si-DLC の血液適合性は SUS 以上、Co-Cr 以下であり、この成績は DLC ステントが臨床使用において顕著な再狭窄抑制効果を示さなかった報告と一致していた。また、新たに合成された生体適合高分子である PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A の血液適合性も蛋白質吸着特性から予測・評価できることが示唆される等、本研究において得られた成績は、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を検証する上で非常に有益な情報となった。

本研究により、医用材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿蛋白質の種類及び量から予測・評価できることが示唆された。今後、標的プロテオミクスにおける標準誤差が統計学的に 95%信頼区間に入るまで繰り返し測定 (n=10) を行い、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を更に検証する。また、本評価法を公定法として広めるため、ELISA 等の簡易な測定系を利用した試験法の開発を目指す。

### A. 研究目的

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、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。

医用材料の蛋白質吸着については、血栓形成や細胞接着等に着目した研究が行われてきたが、材料に吸着する蛋白質の種類を網羅的に解析し、その吸着パターンから材料の機能や生体適合性を評価する研究は現在までに実施されていない。材料表面への蛋白質吸着挙動から細胞や組織に対する影響を評価する手法は材料プロテオームと呼ぶべき新しい分野のプロテオミクスとなる。プロテオミクスの技術は培養細胞や埋植材料周辺域における組織の性状変化の解析等にも利用できる。網羅的解析により特定のバイオマーカを決定することができれば、標的プロテオミクスを利用した同マーカの微量定量が可能となり、材料の機能や生体適合性、細胞又は組織の状態等を判断するための有益な評価手法となり得る。

インプラント型の循環器系医療機器では、長期間に渡って血液凝固や血栓形成等を起こさないことが要求される。血液適合性の評価としては、血栓形成、血液凝固、血小板、溶血性及び補体系の5つの試験項目が存在するが、未だ国際的に十分整合されていない状況にある。そこで本研究では、バイオインターフェースの特性に着目した医用材料の新規評価方法を開発することを目的として、高分子材料等の表面への蛋白質吸着挙動と血液適合性の相関性について検討してきた。

平成24・25年度の本研究において、血

液適合性の異なる23種類の材料に吸着する血漿蛋白質の網羅的比較定量解析（マーカ候補蛋白質の検索）及び標的プロテオミクス解析（マーカ候補蛋白質の有用性検証）を行った結果、FA7、FA9、C1s、C1r、C3、FINC、VTNC及びFHR1が血液適合性評価マーカとして利用できる可能性が示唆された。

平成26年度の本研究では、医用材料の血液適合性と蛋白質吸着挙動の相関性に係る基礎データを更に収集するため、血管ステント用金属材料と新たに合成した高分子材料の蛋白質吸着特性を解析した。

## B. 研究方法

### (1) 金属ステント材料

SUS、SUS/DLC (Diamond-like carbon)、SUS/30%F/DLC、SUS/Si-DLC、Co-Cr及びNi-Tiを使用した。Ni-Tiは円筒状、Co-Crは半円筒状、その他の材料はプレート状であり、いずれの材料も表面粗さを統一した。

### (2) 高分子材料

図1に示したPoly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)、Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate) (PHEMA)、Poly (2-ethoxy-ethyl vinyl ether) (PEOEVE)、Poly (tetrahydrofurfuryl vinyl ether) (PTHFVE)、Poly [2-{2-(2-methoxy-ethoxy) ethoxy} ethyl acrylate-co-butyl acrylate] (PMe3A)のほか、対照として超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) を使用した。

### (3) PCシートの作製

メタノールで洗浄した菅原工業製ポリカーボネート (PC) シート (φ33 mm、厚さ0.1 mm) をADVANTEC製PTFEメンブ

ンフィルタ (φ47 mm、ポアサイズ 0.5 μm) を介して KYOWARIKEN 製スピコータ (K-359SD-1 SPINNER) に固定し、4000 rpm 回転下、PMEA、PHEMA、PEOEVE、PTHFVE 又は PMe3A のメタノール溶液 (1 w/v%、100 μL) を PC シートの中央に滴下し、10 秒間保持した。乾燥後、同様の操作を再度繰り返すことにより、表面を均一にコーティングした。片面のコーティングが終了した後、もう片面を同様に処理して両面コート PC シートを作製した。

#### (4) 血漿蛋白質の吸着と回収

各高分子をコーティングした PC シート (30 枚/試料, PHEMA のみ 60 枚/試料) 又は金属材料 (総面積 100 cm<sup>2</sup>) をそれぞれ個別に 15φ cm ガラス製シャーレ中で 20 mL のヘパリン加ヒト血漿 (コージンバイオ) に 37°C で 1 時間緩やかに振とう/浸漬した後、同血漿を除去した。次いで、同材料を氷冷した 1 mM PBS により 5 回洗浄した後、20 ml の細胞溶解液 (尿素 7M、チオ尿素 2M、Tris 30 mM、CHAPS 4%:pH 8.5) を添加し、室温で 60 分間、緩やかに振とうした。同溶液を Corning 社製 Spin-X UF (Cut Off = 5 kDa) により濃縮し、冷メタノール沈殿法により蛋白質画分を回収し、細胞溶解液に再溶解した後、アプロサイエンス社製 XL-Bradford により蛋白質量を測定した。得られた蛋白質は試験に供するまで凍結保存した。対照試料として、尿素変性ヒト血漿蛋白質及び UHMWPE 吸着蛋白質を同様の方法により調製した。

#### (5) TMT 標識ペプチドの調製

常法に従って還元 (TBP) 及びアルキル化 (ヨードアセトアミド) した蛋白質試

料 (5 μg) を含む細胞溶解液 4 μl に 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (43.6 μl)、プロメガ社製 Protease Max Surfactant (1%, 1.5 μl) 及び Trypsin Gold (1 μg/ml, 0.9 μl) を添加し、37°C で 4 時間インキュベーションした後、10% TFA 2.625 μl を加え、室温で 5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドはバリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 μl) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、200 mM Triethylammonium bicarbonate を 50 μl 添加して溶解した。Thermo Scientific 社製 TMT 6plex 試薬をアセトニトリル 41 μl に溶解した後、各ペプチド試料に同溶液 20 μl を添加し、室温下、1 時間インキュベーションして標識した (表 1)。次いで、5% Hydroxylamine をそれぞれ 4 μl ずつ添加し、室温下、15 分間インキュベートして過剰な標識試薬を失活させた後、各試料を等量ずつ混合した。混合サンプルを Speed Vac に供して、アセトニトリルを揮発させた後、脱塩処理を行った。脱塩したペプチド溶液を、再度、Speed Vac に供して乾燥させた後、0.4 μg/μl の濃度になるように 0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析に供するまで 4°C で保存した。

#### (6) LC-MS/MS 分析

質量分析計は、Thermo Scientific 社製 四重極/フーリエ変換 (FT) ハイブリッド型質量分析計 Q-Exactive を使用し、測定前に Tyrosine-1, 3, 6- Standard (CS Bio Co.) を用いてチューニング及び質量校正を行った。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 kV, キャピラリー温度 250°C) により行った。スキャンデ

ータ (MS スペクトル) は FT analyzer (分解能 70,000, AGC target  $1 \times 10^6$ , 測定質量範囲  $m/z$  350-1400, Lock mass = フタル酸ジエチルヘキシル及びシロキサン, Profile mode) により取得し、XCalibur data dependent mode により、各スキャンにおけるイオン強度の高い 10 種のピークを順次選択して FT analyzer により MS/MS スペクトルを測定した (CID, Collision energy 35 kV, AGC target  $5 \times 10^5$ , Dynamic exclusion duration 30 s, Centroid mode, 分解能 35,000)。測定時間は 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC としては、HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を装備した ADVANCE NanoUPLC (AMR) を使用した。トラップカートリッジ及び分析用逆相カラムとしては、それぞれ CERI 社製 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm)、CERI 社製 L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3  $\mu$ m, 12 nm) を使用した。イオン源としては、バックグラウンド低減装置 (AMR 製 ABIRD) を装備した AMR 社製 Captive Spray イオン源を使用した。Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1% TFA) と B 溶媒 (アセトニトリル) を使用した。流速は 300 nL/min とし、サンプル注入 (2.0  $\mu$ g) はオートサンプラーを使用して行った。一分析当たりの溶出時間は 150 分とし、サンプル注入後、0-40%B/125 min  $\rightarrow$  40-55%B/130 min  $\rightarrow$  100%B/135 min  $\rightarrow$  100%B/140 min  $\rightarrow$  0%B/150 min のグラジエント条件により溶出した。次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。

#### (7) 蛋白質の同定と比較定量

Thermo Scientific 社製蛋白質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア v1.4 を用いて行った。検索エンジン及びデータベースとしては、それぞれ Mascot 及び UniProtKB/Swiss-Prot を利用した。

### C. 研究結果

#### (1) 金属材料の蛋白質吸着挙動

各金属材料から回収された血漿蛋白質量は 0.024-0.212  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> であった (表 1)。また、血漿蛋白質試料に含まれるアルブミン量を 1.00 とした際のアルブミン回収比は 0.016-0.100 であり、洗浄工程により血漿成分が除去されていることが確認された。

LC-MS/MS ショットガン解析において、危険率 5%未満の精度で同定された 169 種類の蛋白質 (総同定数: 2,796) 中、血液凝固に関連すると思われる蛋白質の比較定量解析結果 (SUS=1.00) を表 2 に示した。対照として使用した SUS と比較して、SUS/Si-DLC は C1 系補体と一部の抗体の吸着量が半減していたが、その他の血液凝固関連蛋白質の吸着挙動は SUS と同等であった。SUS/DLC には、FIBB 及び FIBG が有意に吸着したが、その他の蛋白質群の吸着量は全体的に SUS を下回ることが確認された。一方、SUS/30%F/DLC、Co-Cr 及び Ni-Ti への血液凝固関連蛋白質の吸着量はいずれも低値であり、特に SUS/30%F/DLC 及び Ni-Ti では、C3、C4、CFAB、VTNC 及び VWF 等の吸着が抑制されていた。これらの蛋白質吸着挙動から判定した各金属材料の血液適合性は SUS/30%F/DLC = Ni-Ti > Co-Cr > SUS/DLC > SUS/Si-DLC > SUS の順になることが明らかになった。

## (2) 高分子材料の蛋白質吸着挙動

各高分子材料をコーティングした PC シート表面から回収された血漿蛋白質量は 0.028-0.155  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であった (表 1)。また、血漿蛋白質試料に含まれるアルブミン量を 1.00 とした際のアルブミン回収比は 0.018-0.099 であり、洗浄工程により血漿成分が除去されていることが確認された。

LC-MS/MS ショットガン解析において、危険率 5%未満の精度で同定された 149 種類の蛋白質 (総同定数 : 2,704) 中、血液凝固に関連すると思われる蛋白質の比較定量解析結果 (UHMWPE=1.00) を表 3 に示した。対照として使用した UHMWPE と比較して、いずれの高分子材料もアルブミン吸着量は低下していたが、PMe3A には補体、FINC 及び抗体が有意に吸着することが判明した。一方、PMEA と PTHFVE への血液凝固関連蛋白質の吸着量は全体的に少なく、血液適合性評価マーカとして着目している C1r、C1s、C3、FINC 及び VTNC とともに低値を示した。UHMWPE と比較して、PHEMA では FINC 及び ITA1 の吸着が 1/2 程度に抑制されていたが、補体及び抗体の中には有意に濃縮される蛋白質が散見された。PEOEVE の場合、C1q、C1s、C9、ITA1 及び VTNC のほか、フィブリノゲン、FINC 及び抗体の吸着量が低下する傾向が認められた。これらの蛋白質吸着挙動から判定した各高分子材料の血液適合性は PMEA>PTHFVE>>PEOEVE>PHEMA>UHMWPE>>PMe3A の順になることが明らかになった。

## D. 考 察

本研究では、バイオインターフェースの特性に着目した新たな血液適合性試験法の有用性を検証する一環として、金属

ステント材料の血液適合性を我々が選定した血液適合性評価マーカ蛋白質の吸着特性から予測し、得られた成績を過去に報告された *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果と比較検討した。また、新規材料開発支援ツールとしての応用を目指し、新たに合成された生体適合高分子材料の血液適合性を蛋白質吸着挙動から予測・評価した。

## (1) 金属材料

近年、狭心症、心筋梗塞及び重症下肢虚血等の虚血性疾患に対してステント治療が盛んに行われている。血管ステントには冠動脈ステント、下肢 (末梢血管用) ステント及び頸動脈ステント等が存在する。最近では、ポリ乳酸、ポリ乳酸/ポリグリコール酸重合体及びマグネシウムを使用した生体吸収性ステントが開発されているが、従来ステントのプラットフォームは SUS、Co-Cr、Ni-Ti 等の金属から構成されている。ステント治療の有害事象として観察される再狭窄とステント血栓症の問題は未解決であり、新規材料や新たな *in vivo* 評価法の開発が進められている。

ステント留置後の再狭窄は、ステントストラット及び血管内皮の損傷部位への血栓付着を契機として活性化された好中球やマクロファージ等がサイトカインや成長因子等を放出し、中膜平滑筋細胞が内膜側に遊走・増殖して細胞外基質を巻き込んだ厚い新生内膜を形成することに由来する<sup>1-3)</sup>。従来、ステント留置に伴う再狭窄は主にブタ冠動脈を用いた動物実験における病理組織学的解析により行われてきたが、同一個体内における経時的変化を検討することを目的として、血管

内超音波法を利用してステント留置後の血管壁や血管内腔の経時的な変化を評価する方法が開発された<sup>4)</sup>。

DLC は低摩擦や低摩耗、高硬度、化学的安定性等様々な特性を有するため、1990 年代よりバイオマテリアル分野への応用研究が始まり、DLC の優れた生体適合性や血小板吸着の抑制効果や蛋白質吸着抑制効果効果が報告された<sup>5-7)</sup>。ステントへの応用は 2000 年頃から報告されており、DLC コーティングによる抗血栓性効果や新生内膜増殖の抑制効果が血液回路を用いた *in vitro* 実験や動物実験等により明らかとされた<sup>8,9)</sup>。これらの結果に基づき DLC 系コーティングステントが発売されたが、臨床使用においては従来の金属ステントと比較して著明な再狭窄抑制効果が認められなかった<sup>10-12)</sup>。一方、DLC にフッ素を組み込むことにより、疎水性、柔軟性及び抗血栓性を付与したフッ素添加 DLC (F-DLC) は、SUS や DLC と比較して、ヒト血液を利用した実験において血小板付着抑制能を示すと共に、ラット皮下における炎症反応を過度に惹起しないことが確認されている<sup>13-15)</sup>。F-DLC は DLC と比較して血小板の活性化を抑制する効果や蛋白質吸着を減少させる効果を有することも *in vitro* 実験において確認された<sup>16)</sup>。ステントへの DLC 系コーティングは、ステント拡張時のコーティングの剥離やひび割れが問題視されてきたが<sup>17)</sup>、フッ素添加による柔軟性の向上とケイ素を含有した中間層を追加して表面自由エネルギーを調整することにより、F-DLC 膜の基材への接着性が向上し、ステント拡張時の剥離やひび割れの問題が解決されている<sup>18)</sup>。近年、ミニブタを用いた動物実験において、F-DLC ステント留

置後の新生内膜の増殖から軽度退縮に至る経時的変化が血管内超音波法により評価された結果、従来の金属ステントと比較して、F-DLC ステントの狭窄率ピークは有意に低下することが明らかにされている<sup>4)</sup>。

本研究において使用した SUS/30%F/DLC に吸着する総蛋白質量は、その他の材料と比較して若干高い傾向が認められたが (表 1)、血液凝固関連蛋白質の吸着は SUS や Co-Cr と比較して顕著に抑制されており、ヒト血液を用いた *in vitro* 試験 (血小板付着抑制) やミニブタを使用した *in vivo* 試験 (再狭窄抑制) と一致する成績が得られた。本研究において確認された SUS/DLC 及び中間層にケイ素を導入した SUS/Si-DLC の血液適合性は SUS 以上、Co-Cr 以下であり、この成績は DLC ステントが臨床使用において顕著な再狭窄抑制効果を示さなかった報告と一致していた。

血管ステント留置後の再狭窄は、ステント自体の血液適合性、血管内壁に対する物理的刺激による損傷又は炎症誘導のほか、溶出する金属イオン等によるアレルギー性炎症反応の惹起に起因する。Ni-Ti は、総蛋白質吸着量が最も低く、血液凝固関連蛋白質の吸着挙動から、SUS/30%F/DLC に匹敵する優れた血液適合性を有することが予測された。しかし、従来の金属ステントと比較して、SUS/30%F/DLC の再狭窄率は有意に低いことが過去に報告された *in vivo* 試験により示唆されていることから、血管ステントの生物学的安全性は血液適合性のほか、材質や形状の相違による周辺組織への影響も含めて、総合的に評価する必要があることが再確認された。



## (2) 高分子材料

血液適合性材料として、超親水性表面、ミクロ相分離表面、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来たが、近年、材料表面の水和状態が血液適合性（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、 $-50^{\circ}\text{C}$ 付近で低温結晶を形成する中間水及び  $0^{\circ}\text{C}$ 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ほか、中間水を持つことが確認されている。

細胞膜と類似したベタイン構造を持つポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (PMPC) は中間水を有する代表的な高分子材料の一つであり、蛋白質吸着能や細胞接着能が非常に低く、血栓が形成されない性質を持つことから、血液適合性が要求される医療機器や医用材料の表面加工に利用されている<sup>19-22)</sup>。

PMEA も中間水を有する代表的な高分子材料である。PMEA は、有機溶媒への易溶解性、非水溶性、透明性、粘着性を併せ持っていることから様々な基材へのコーティングが可能である<sup>23-30)</sup>。また、PMEA 表面は、血漿蛋白質の吸着・変性が少なく、脱離速度も早い特徴を持つことが知られている。PHEMA も蛋白質吸着が比較的少ない生体適合性材料であり、コンタクトレンズをはじめとした各種の医療機器に利用されている。PHEMA は、PMEA と異なり  $-50^{\circ}\text{C}$ 付近に中間水ピークが認められないが、核酸や多糖類等の生体成分と同様、低温凝固水を有する高分子材料で

ある。

PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A は PMEA 類縁体であり、いずれも中間水を有する化合物である。PTHFVE は含水量 (42.4%) が比較的高い高分子材料であり、中間水の融解点が  $-7^{\circ}\text{C}$ 付近に存在する。また、PTHFVE は血小板吸着数が低く、優れた抗血栓性を有することが予測されている。MEA とブチルアクリレート (BA) のランダム共重合体 (MEA/BA=30/70) である PMe3A の中間水量は  $0.008\text{ g/g}$  であり、PMEA ( $0.042\text{ g/g}$ ) と比較して低い値を示す。PEOEVE も中間水を有する化合物であるが、血小板粘着等をはじめとした各種特性は検証中である。

現在までに選定した血液適合性評価マーカ候補に着目して、新規高分子材料である PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A の特性を検討した結果、PMe3A は対照として用いた UHMWPE よりも血液適合性に劣る成績が得られた。これは PMe3A の中間水量が PMEA と比較して少ないと共に、中間水を持たない BA ユニットが密集する構造が分子中に存在する可能性があることに由来すると考えられる。後者の問題は、ランダム共重合体ではなく、ユニット共重合体を合成することにより解消できるため、今後、分子設計を最適化する必要があると思われる。一方、血液適合性評価マーカ候補蛋白質の吸着挙動が PMEA とほぼ同等である PTHFVE は PMEA に匹敵する優れた血液適合性を有することが示唆された。PEOEVE への血液凝固関連蛋白質の吸着は抑制される傾向が認められたが、C1 系及び C9 を除く補体の吸着量が UHMWPE と同等であると共に、FINC 及び VTNC の吸着能も十分抑制されていないことから、PEOEVE の血液適合性は PMEA 及び PTHFVE

と比較して劣ることが示唆された。水酸基を有する PHEMA は UHMWPE とほぼ同等の補体吸着特性を示し、PMEA や PTHFVE と異なり、補体を吸着し易い性質を有することが再確認された。

以上、医用材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿蛋白質の種類及び量から予測・評価できることが示唆された。今後、標的プロテオミクスにおける標準誤差が統計学的に 95%信頼区間に入るまで繰り返し測定 (n=10) を行い、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を更に検証する。また、本評価法を公定法として広めるため、ELISA 等の簡易な測定系を利用した試験法の開発を目指す。

#### E. 結論

蛋白質吸着挙動から予測・評価した金属ステント材料の血液適合性は、過去に報告された各種血管ステントの *in vitro* 試験、動物実験及び臨床評価において得られた知見と一致していた。また、新たに合成された生体適合高分子の血液適合性も蛋白質吸着特性から予測・評価できることが示唆される等、本研究において得られた成績は、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を検証する上で非常に有益な情報となった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表等

<誌上発表>

- 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, Niimi S. Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 102B:721-728 (2014).
- 4) 靛島由二. 第1部: 医療機器市場の拡大と新規製品の開発: 開発, 上市化, 市場確保において留意すべきポイント. 生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略 (監修: 田中 賢). サイエンス&テクノロジー, pp. 3-21 (2014).
- 5) 新見伸吾, 梅津光夫, 伊関 洋, 岩崎清隆, 笠貫 宏, 原田 昇, 光石 衛, 北森武彦, 鄭 雄一, 中岡竜介, 靛島由二. 早稲田大学先端生命科学センター (TWIns) 及び東京大学大学院工学

系研究科との連携による革新的医薬品・医療機器・再生医療製品等実用化促進事業. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 132:16-18 (2014).

- 6) 中岡竜介, 靛島由二, 新見伸吾. 医療機器・材料の国際標準化動向. バイオマテリアル-生体材料, 33(1):56-63 (2015).

#### <学会発表>

- 1) 植松美幸, 靛島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 医用材料の生体適合性評価指標開発を目的とした表面の水和上体に関する分子動力学シミュレーション. 第 54 回日本生体医工学会大会 (2014 年 5 月・名古屋).
- 2) 中岡竜介, 靛島由二, 新見伸吾. 橋渡し研究及び国際標準化の行政的支援. 第 53 回日本生体医工学会大会 (2014 年 6 月・仙台).
- 3) 靛島由二, 福井千恵, 比留間 瞳, 野村祐介, 田中 賢, 新見伸吾. 蛋白質吸着挙動に基づく血液適合性評価マーカの検証に関する研究. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 4) 靛島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園 知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上 薫, 森川朋美, 市村亮平, 前田 潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑. 新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 5) 靛島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 向井智和, 野村祐介, 伊佐間和郎<sup>1</sup>, 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).
- 6) 野村祐介, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 杉山知子, 竹ノ内美香, 新見伸吾, 靛島由二. 簡易溶血性試験法の性能評価と公定法との比較検証. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 7) 野村祐介, 福井千恵, 戸井田 瞳, 新見伸吾, 宮川 伸, 金 玲, 中村義一, 靛島由二. RNA アプタマーを用いた新規医用材料の開発. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 8) 加藤玲子, 靛島由二, 福井千恵, 比留間 瞳, 宮島敦子, 新見伸吾. ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 9) 植松美幸, 靛島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 分子動力学シミュレーションによる PMEAA 分子に存在する水の挙動解析. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 10) 迫田秀行, 柚場俊康, 向井智和, 新見伸吾, 靛島由二. 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの力学特性. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 11) 靛島由二. 医療機器・再生医療等製品分野におけるエンドトキシンの諸問題. 第 30 回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム

(2015年3月・品川).

- 12) Olsen DS, Lee M, Turley A, Sasaki S, Yamasaki K, Fukui C, Nomura Y, Kato R, Yuba T, Sakaguchi K, Haishima Y. Extractable positive control for in vitro skin irritation testing of medical devices. 54th Annual Meeting and ToxExpo (March 22-25, 2015, San Diego).

#### <知的財産権の出願・登録状況>

- 1) 齋島由二, 福井千恵, 河上強志, 迫田秀行, 野村祐介, 伊佐間和郎, 新見伸吾, 柚場俊康, 向井智和, 清麻里子. 「医療用バッグ」. 出願番号: 特願2015-17514, 出願日: 2015年1月30日.

#### 参照資料

- 1) Welt FG, Rogers C. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 22:1769 (2002).
- 2) Anderson HV, McNatt J, Clubb FJ, Herman M, Maffrand JP, DeClerck F, Ahn C, Buja LM, Willerson JT. *Circulation*, 104:2331 (2001).
- 3) Rosanio S, Tocchi M, Patterson C, Runge MS. *Thromb. Haemost.*, 82 Suppl 1:164 (1999).
- 4) 石川 治. ミニブタを用いたステント評価モデルの確立とその応用: ステント内狭窄の経時的な解析. NEDO/イノベーション推進事業成果報告書 ([http://repository.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/dspace/bitstream/2261/52978/1/h23\\_ishikawa.pdf](http://repository.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/dspace/bitstream/2261/52978/1/h23_ishikawa.pdf)).
- 5) Thomson LA, Law FC, Rushton N, Franks J. *Biomaterials*, 12:37 (1991).
- 6) Yang P, Huang N, Leng YX, Chen JY, Fu RK, Kwok SC, Leng Y, Chu PK. *Biomaterials*, 24:2821 (2003).
- 7) Jones MI, McColl IR, Grant DM, Parker KG, Parker TL. *J. Biomed. Mater. Res.* 52:413 (2000).
- 8) Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Fenner T, Grewe P, Koester R, Padmanaban K, Kuehnl P. *Thromb. Res.*, 99:577 (2000).
- 9) De Scheerder I, Szilard M, Yanming H, Ping XB, Verbeken E, Neerinck D, Demeyere E, Coppens W, Van de Werf F. *J. Invasive Cardiol.*, 12:389 (2000).
- 10) Airolidi F, Colombo A, Tavano D, Stankovic G, Klugmann S, Paolillo V, Bonizzoni E, Briguori C, Carlino M, Montorfano M, Liistro F, Castelli A, Ferrari A, Sgura F, Di Mario C. *Am. J. Cardiol.*, 93:474 (2004).
- 11) Meireles GC, de Abreu LM, Forte AA, Sumita MK, Sumita JH, Aliaga Jdel C. *Arq. Bras. Cardiol.*, 88:390 (2007).
- 12) Riezebos R, Ronner E, Kiemeneij F, Laarman GJ. *Int. J. Cardiovasc. Intervent.*, 6:137 (2004).
- 13) Ho JY, Matsuura T, Santerre JP. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 11:1085 (2000).
- 14) Lamperti A, Bottani CE, Ossi PM. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16:126 (2005).
- 15) Hasebe T, Shimada A, Suzuki T, Matsuoka Y, Saito T, Yohena S, Kamijo A, Shiraga N, Higuchi M, Kimura K, Yoshimura H, Kuribayashi S. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 76:86 (2006).
- 16) Hasebe T, Yohena S, Kamijo A, Okazaki Y, Hotta A, Takahashi K, Suzuki T. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 83:1192 (2007).
- 17) Roy RK, Lee KR. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl Biomater.*, 83:72 (2007).
- 18) Hasebe T, Murakami K, Nagashima S, Takahashi K, Suzuki T. *Diamond & Related Materials*, 20:902 (2011).
- 19) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi. *J. Biomed. Mater. Res.*, 39:323 (1998).
- 20) K. Ishihara, E. Ishikawa, T. Mihara, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi. *J. Biomater. Scie. Polym. Ed.*, 10:1047 (1999).
- 21) H. Kitano, M. Imai, T. Mori, M. Gemmei-Ide, Y. Yokoyama and K. Ishihara. *Langmuir*, 19:10266 (2003).
- 22) T. Hatakeyama, M. Tanaka and H. Hatakeyama. *Acta. Biomaterialia.*, 3:6091 (2009).
- 23) M. Tanaka, T. Motomura, M. Kawada, T. Anzai, Y. Kasori, T. Shiroya, K. Shimura, M. Onishi and A. Mochizuki. *Biomaterials*, 21:1471 (2000).

- 24) M. Tanaka, T. Motomura, N. Ishii, K. Shimura, M. Onishi, A. Mochizuki and T. Hatakeyama. *Polym. Int.*, 49 : 1709 (2000).
- 25) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Motomura, K. Shimura, M. Ohnishi and Y. Okahata. *Colloids. Surf., A*, 193 : 145 (2001).
- 26) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Shiroya, T. Motomura, K. Shimura, M. Ohnishi and Y. Okahata. *Colloids. Surf., A*, 203 : 195 (2002).
- 27) T. Ansai, A. Okumura, M. Kawamura, K. Yokoyama, H. Oshiyama, T. Kido and C. Nojiri. *Jpn. J. Artif. Organs.*, 9 : 73(2000).
- 28) N. Saito, S. Motoyama and J. Sawamoto. *Jpn. J. Artif. Organs.*, 24 : 547 (2000).
- 29) M. Tanaka and A. Mochizuki, *J. Biomed. Mater. Res., A*, 68 : 684 (2004).
- 30) M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura and T. Hatakeyama. *Biomacromolecules*, 3 : 36 (2002).

表1. TMT標識と蛋白質回収量

Metal sample	TMT reporter ion (m/z)	Protein recovery (µg/cm <sup>2</sup> )	Polymer sample	TMT reporter ion (m/z)	Protein recovery (µg/cm <sup>2</sup> )
SUS/DLC	126	0.137	PHEMA	126	0.028
SUS/30%F/DLC	127	0.212	PMEA	127	0.062
Co-Cr	128	0.118	PEOEVE	128	0.040
Ni-Ti	129	0.024	PTHFVE	129	0.038
SUS/Si-DLC	130	0.079	PMe3A	130	0.089
SUS	131	0.126	UHMWPE	131	0.155

表2. 金属材料に吸着する血液凝固関連蛋白質の比較定量解析結果

Description	MW [kDa]	Calc. pI	Score	Coverage	Unique Peptides	SUS/DLC	SUS/30%F/DLC	Co-Cr	Ni-Ti	SUS/Si-DLC
Coagulation factor V [FA5]	251.5	6.05	35.80	0.63	1	0.733	0.068	0.118	0.060	1.153
Collagen alpha-1(VIII) chain [CO8A1]	73.3	9.61	0.00	1.34	1	0.372	0.066	0.210	0.047	1.167
Complement C1q subcomponent subunit A [C1QA]	26.0	9.11	28.49	11.02	1	0.044	0.042	0.041	0.032	0.355
Complement C1q subcomponent subunit B [C1QB]	26.7	8.63	50.68	18.18	2	0.068	0.161	0.129	0.044	0.720
Complement C1r subcomponent [C1R]	80.1	6.21	147.47	17.16	8	0.152	0.031	0.069	0.024	0.416
Complement C1s subcomponent [C1S]	76.6	4.96	180.34	15.99	7	0.154	0.043	0.085	0.111	0.390
Complement C3 [CO3]	187.0	6.40	875.47	16.60	17	0.541	0.085	0.164	0.069	0.986
Complement C4-A [CO4A]	192.7	7.08	75.46	3.61	1	0.765	0.076	0.202	0.074	1.224
Complement C4-B [CO4B]	192.6	7.27	68.43	3.61	1	0.830	0.068	0.372	0.074	1.224
Complement component C9 [CO9]	63.1	5.59	87.23	14.13	4	0.411	0.091	0.121	0.053	0.869
Complement factor B [CFAB]	85.5	7.06	0.00	1.83	1	0.638	0.069	0.889	0.050	1.418
Fibrinogen alpha chain [FIBA]	94.9	6.01	579.65	10.97	10	1.716	0.085	0.215	0.086	1.439
Fibrinogen beta chain [FIBB]	55.9	8.27	316.51	18.33	7	3.771	0.037	0.133	0.052	1.972
Fibrinogen gamma chain [FIBG]	51.5	5.62	337.08	32.45	9	4.293	0.152	0.182	0.057	1.956
Fibrinectin [FINC]	262.5	5.71	410.77	3.86	5	1.352	0.141	0.108	0.049	1.153
Ig alpha-2 chain C region [IGHA2]	36.5	6.10	90.59	9.41	1	0.337	0.097	0.107	0.096	0.578
Ig gamma-1 chain C region [IGHG1]	36.1	8.19	2463.90	55.76	10	0.340	0.048	0.146	0.036	0.748
Ig gamma-2 chain C region [IGHG2]	35.9	7.59	718.02	36.20	5	0.478	0.065	0.151	0.039	0.789
Ig gamma-3 chain C region [IGHG3]	41.3	7.90	1700.44	42.44	4	0.318	0.045	0.132	0.031	0.731
Ig heavy chain V-III region GAL [HV320]	12.7	8.48	0.00	7.76	1	0.366	0.038	0.294	0.030	0.731
Ig heavy chain V-III region VH26 [HV303]	12.6	8.28	95.34	16.24	1	0.644	0.080	0.119	0.073	1.013
Ig kappa chain C region [IGKC]	11.6	5.87	2942.73	64.15	5	0.239	0.060	0.098	0.050	0.615
Ig kappa chain V-I region CAR [KV104]	11.7	9.41	0.00	16.82	1	0.332	0.076	0.206	nd	0.718
Ig kappa chain V-I region HK102 (Fragment) [KV110]	12.8	6.51	57.40	15.38	1	0.418	0.036	0.265	0.058	0.812
Ig kappa chain V-I region Lay [KV113]	11.8	7.96	36.52	8.33	1	0.254	0.014	0.181	nd	0.587
Ig kappa chain V-I region Roy [KV116]	11.8	5.36	32.93	7.41	1	0.344	nd	0.194	nd	0.545
Ig kappa chain V-III region B6 [KV301]	11.6	9.25	83.10	16.67	1	0.431	0.225	0.233	0.187	0.881
Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment) [KV303]	10.7	6.52	35.19	9.00	1	0.298	0.054	0.166	0.022	0.539
Ig kappa chain V-III region SIE [KV302]	11.8	8.48	137.44	39.45	1	0.270	0.051	0.176	0.031	0.547
Ig kappa chain V-III region Ti [KV304]	11.8	8.50	135.73	39.45	1	0.479	0.060	0.129	0.031	0.651
Ig kappa chain V-III region VG (Fragment) [KV309]	12.6	4.96	0.00	26.09	1	0.409	0.387	0.383	0.385	0.367
Ig kappa chain V-IV region Len [KV402]	12.6	7.93	54.77	7.89	1	0.604	0.064	0.259	0.052	0.933
Ig lambda chain V-III region LO1 [LV302]	11.9	5.08	0.00	7.21	1	0.497	0.026	0.517	0.013	0.773
Ig lambda-2 chain C regions [LAC2]	11.3	7.24	1365.87	79.25	2	0.403	0.077	0.099	0.060	0.749
Ig lambda-7 chain C region [LAC7]	11.3	8.28	555.88	55.66	1	0.261	0.064	0.076	0.047	0.589
Ig mu chain C region [IGHM]	49.3	6.77	1777.56	34.73	4	0.226	0.087	0.124	0.092	0.471
Ig mu heavy chain disease protein [MUCB]	43.0	5.24	1676.62	38.11	1	0.244	0.089	0.124	0.096	0.452
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 [IGLL5]	23.0	8.84	1158.28	35.05	2	0.388	0.098	0.101	0.076	0.851
Serum albumin [ALBU]	69.3	6.28	814.77	29.56	18	0.515	0.068	0.260	0.061	1.644
Vitronectin [VTNC]	54.3	5.80	99.07	16.53	7	0.612	0.050	0.147	0.033	0.967
von Willebrand factor [VWF]	309.1	5.48	0.00	0.64	1	0.236	0.088	0.228	0.059	1.232

<sup>1</sup>nd, not detected.

吸着量(SUS=1.00): ■ 2倍以上, ■ 1/2以下, ■ 1/5以下



表3. 高分子材料に吸着する血液凝固関連蛋白質の比較定量解析結果

Description	MW [kDa]	Calc. pI	Score	Coverage	Unique Peptides	PHEMA	PMEA	PEOEVE	PTHFVE	PMe3A
Coagulation factor V [FA5]	251.5	6.05	41.02	0.63	1	0.388	0.079	0.298	0.059	1.191
Complement C1q subcomponent subunit A [C1QA]	26.0	9.11	46.18	11.02	1	2.734	0.250	0.342	nd <sup>1)</sup>	16.248
Complement C1r subcomponent [C1R]	80.1	6.21	35.72	2.13	1	1.167	0.012	0.573	nd	2.446
Complement C1s subcomponent [C1S]	76.6	4.96	28.49	3.49	2	1.464	0.073	0.228	0.121	2.753
Complement C3 [CO3]	187.0	6.40	1991.45	26.70	34	0.935	0.231	1.227	0.223	5.535
Complement C4-A [CO4A]	192.7	7.08	723.81	14.51	1	1.207	0.598	1.034	0.347	7.346
Complement C4-B [CO4B]	192.6	7.27	855.34	14.51	1	1.255	0.556	1.023	0.347	7.346
C4b-binding protein alpha chain [C4BPA]	67.0	7.30	107.39	16.58	6	1.048	0.381	0.981	0.397	5.591
C4b-binding protein beta chain [C4BPB]	28.3	5.14	43.68	5.56	1	0.859	0.491	0.677	0.186	9.506
Complement C5 [CO5]	188.2	6.52	161.86	3.40	3	0.920	0.092	0.989	0.106	2.211
Complement component C9 [CO9]	63.1	5.59	63.54	8.94	3	0.541	0.071	0.298	0.065	2.155
Complement factor B [CFAB]	85.5	7.06	0.00	1.83	1	0.986	0.045	0.884	0.039	1.171
Fibrinogen alpha chain [FIBA]	94.9	6.01	509.54	16.05	13	0.781	0.058	0.492	0.066	1.365
Fibrinogen beta chain [FIBB]	55.9	8.27	131.65	17.52	9	0.664	0.034	0.406	0.054	1.377
Fibrinogen gamma chain [FIBG]	51.5	5.62	217.85	31.13	10	0.645	0.045	0.461	0.038	1.149
Fibronectin [FINC]	262.5	5.71	159.62	0.71	1	0.506	0.261	0.579	0.238	3.265
Ig alpha-2 chain C region [IGHA2]	36.5	6.10	37.16	9.41	1	1.048	0.287	0.326	0.241	2.849
Ig gamma-1 chain C region [IGHG1]	36.1	8.19	1687.89	42.42	6	0.555	0.051	0.456	0.031	1.835
Ig gamma-2 chain C region [IGHG2]	35.9	7.59	414.59	26.07	5	0.523	0.056	0.440	0.040	1.493
Ig gamma-3 chain C region [IGHG3]	41.3	7.90	1183.90	32.10	3	0.825	0.047	0.448	0.046	1.973
Ig heavy chain V-III region BUT [HV306]	12.4	9.25	36.20	16.52	1	0.931	0.068	0.317	0.041	2.186
Ig heavy chain V-III region GAL [HV320]	12.7	8.48	0.00	7.76	1	1.169	0.156	1.243	0.068	4.457
Ig heavy chain V-III region TEI [HV316]	12.8	8.50	35.09	15.97	1	0.900	0.081	0.335	0.071	1.655
Ig heavy chain V-III region VH26 [HV303]	12.6	8.28	104.19	16.24	1	0.944	0.030	0.293	0.070	1.434
Ig kappa chain C region [IGKC]	11.6	5.87	1728.03	64.15	5	0.476	0.070	0.409	0.086	1.738
Ig kappa chain V-I region HK102 (Fragment) [KV110]	12.8	6.51	38.82	15.38	1	0.778	0.118	0.443	0.058	2.666
Ig kappa chain V-I region Lay [KV113]	11.8	7.96	0.00	8.33	1	0.575	0.048	0.436	nd	1.543
Ig kappa chain V-III region B6 [KV301]	11.6	9.25	34.59	16.67	1	1.010	0.616	1.171	0.548	3.067
Ig kappa chain V-III region SIE [KV302]	11.8	8.48	45.05	22.94	2	0.944	0.140	0.688	nd	2.307
Ig kappa chain V-IV region Len [KV402]	12.6	7.93	50.28	7.89	1	0.677	0.094	0.565	0.152	1.908
Ig lambda chain V-III region LO1 [LV302]	11.9	5.08	30.31	7.21	1	0.619	0.054	0.721	0.117	1.152
Ig lambda-2 chain C regions [LAC2]	11.3	7.24	861.47	65.09	2	0.556	0.097	0.444	0.091	2.903
Ig lambda-7 chain C region [LAC7]	11.3	8.28	296.57	55.66	1	0.610	0.088	0.561	0.061	2.343
Ig mu chain C region [IGHM]	49.3	6.77	2070.82	44.69	8	2.301	0.323	1.141	0.285	6.867
Ig mu heavy chain disease protein [MUCB]	43.0	5.24	1920.61	42.20	1	2.366	0.327	1.145	0.301	6.991
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 [IGLL5]	23.0	8.84	737.56	34.58	3	0.605	0.121	0.473	0.188	3.373
Integrin alpha-1 [ITA1]	130.8	6.29	0.00	1.10	1	0.514	0.046	0.295	0.022	1.523
Serum albumin [ALBU]	69.3	6.28	699.54	27.59	17	0.255	0.041	0.088	0.036	0.368
Vitronectin [VTNC]	54.3	5.80	29.16	7.32	3	1.151	0.107	0.430	0.070	1.181

<sup>1)</sup>nd, not detected.

吸着量 (UHMWPE=1.00): ■ 5倍以上, ■ 2倍以上, ■ 1/2以下, ■ 1/5以下

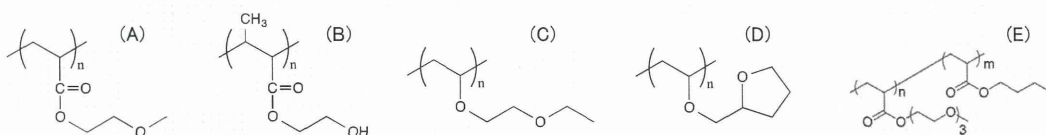


図1. 高分子材料の化学構造. A) PMEA, B) PHEMA, C) PTHFVE, D) PEOEVE, E) PMe3A.

## 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

### 分担研究課題名

医用材料の血液適合性を含む生体適合性における細胞応答に関する研究

研究分担者 宮島敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
研究協力者 小森谷薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
比留間瞳 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
田中 賢 山形大学大学院理工学研究科

### 研究要旨

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については、血液適合性試験が要求される。現在、本邦においては、平成24年3月に発出された通知をもとに試験が実施されている。この通知において、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の5つの試験項目が挙げられている。評価項目の中から製品の用途、血液との接触期間等に応じて選択、実施されるが、試験の実施方法についての詳細な記載があるのは溶血性試験についてのみであり、ヒトの血液を用いて実施する試験法については、試験系の適切性、検出感度などについての検証が十分に行われていない。

本年度の研究においては、陽性対照PCシートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 $\beta$ -TG、SC5b-9の各マーカー蛋白質量を測定した結果、インキュベーション時間に応じて、TAT、 $\beta$ -TG、SC5b-9量の増加が観察された。TAT、 $\beta$ -TGではPCシートの共存により、マーカー蛋白質量の増加が観察された。次に、混合比の異なる2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) / 2-methoxyethyl acrylate (MEA)ランダム共重合体をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、蛋白質マーカーを指標とする各評価項目の特性について検討した。TAT、 $\beta$ -TG、C5a、SC5b-9では、HEMA/MEAシートにおけるMEA量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察され、TAT、 $\beta$ -TGでは、対照シート

(PET、PC)におけるマーカー蛋白産生の増加が観察されたことから、高分子材料の血液適合性は、TAT、 $\beta$ -TGを指標として評価するのが適している可能性が示された。更に、新規材料PMe3A、PEOEVE、PTHFVEに対して血液適合性試験を実施し、TAT及び $\beta$ -TGの活性化について検討したところ、両マーカー共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE順に値が小さくなっていた。

今後、引き続き生体適合性の異なる高分子材料を用いて血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について総合的に検証を進め、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。



## A. 研究目的

医用材料の生体適合性は、材料表面の物理学的特性により大きく影響される。循環器系医療機器の基本的かつ最も重要な特性として、血液との接触があげられる。特に埋植する機器では、長期間にわたって血液凝固、血栓形成を起こさないことが要求される。医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については、血液適合性試験が要求される。本邦においては、平成24年3月に「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」

(薬食機発0301第20号通知)が発出され、現在はこの通知を元に、生物学的安全性試験が行われている。「第8部 血液適合性試験」においては、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の5つの試験項目が挙げられており、それぞれの試験項目について標準的な評価項目が挙げられている(図1)。この中で試験法について詳細な記載があるのは溶血試験についてのみである。本研究では、「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」の一環として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の各試験法の国際整合に必要な基礎データの収集を行い、試験の妥当性についての総合的な検証を行うことを目的とする。評価においては、本研究班において、医用材料/細胞界面特性に着目した、生体反応、細胞機能等への影響におけるマーカー検索、分子動力的シミュレーショングループの研究結果と合わせ、新たな評価手法の開発を目指す。本研究の成果は、新規医療機器の開発及び承認審査の迅速化に寄与するほか、ISOやJIS規格にフィードバックできる等、厚生行政的にも重要であると思われる。

本年度の研究においては、陽性対照とし

てPCシートを用い、インキュベーション時の基礎的な実験条件について、血液凝固においてはトロンビン-抗トロンビン複合体(TAT)、血小板放出因子( $\beta$ -トロンボグロブリン( $\beta$ -TG))、補体系では補体活性化産物SC5b-9の各マーカー蛋白質量を指標として検討を行なった。次に、混合比の異なる2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)/2-methoxyethyl acrylate (MEA)ランダム共重合体をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、血液凝固においてはTAT、血小板においては血小板放出因子 $\beta$ -TG、補体系では補体活性化産物(C3a、C5a、SC5b-9)を指標とする評価項目について検討を行い、各試験法の特性、妥当性についての検証、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集した。更に、新規材料poly 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl acrylate-co-butyl acrylate (30:70 mol%) (PME3A)、poly (2-ethoxyethyl vinyl ether) (PEOEVE)、poly (tetrahydrofuran-2-ylmethyl vinyl ether) (PTHFVE)について、既に評価を実施したPHEMA、PMEAと共に血液適合性試験を行い、TAT及び $\beta$ -TGのレベルについて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

Polycarbonate (PC) シート (34 mm  $\phi$ 、厚さ0.1mm、菅原工芸)に、HEMA : MEA = 100% : 0% (PHEMA)、75% : 25% (H75M25)、50% : 50% (H50M50)、25% : 75% (H25M75)、0% : 100% (PMEA) の5段階の混合比のHEMA/MEAランダム共重合体ポリマー溶液を両面コートした。コート方法は、1 wt % (MeOH) 溶液を、滴下量100 $\mu$ Lでスピンコート(4000 rpm, 10 sec, 表裏各2回コート)した。対照シートとして、PCシート(未コート)及び

Polyethylene terephthalate (PET) シート (未コート) を用いた。HMEA/MEA コートシートの接触角を測定した。接触角は、HMEA/MEA コートした PC シートに Milli Q 水 2 $\mu$ L を滴下して、20 秒後に接触角を測定した。測定は 5 回行い平均値を求めた。PBS 浸漬の接触角は、シートを PBS に浸漬し 37°C で一晩インキュベートし、シートを Milli Q 水で洗浄後、室温で乾燥したシートを用いて同様に測定した。

新規材料 PMe3A、PEOEVE、PTHFVE についても同様に PC シートにコートして用いた。

HEMA/MEA、PMe3A、PEOEVE、PTHFVE 液は、共同研究者の田中先生より供与いただいた。

## 2. 血液適合性試験

### 1) 採血

翼付針 (テルモ、21G) を用い、組織因子を含む血液を除くため、まず 5 mL 注射筒 (テルモ) で採血後、30 mL 注射筒 (テルモ、予めヘパリン (田辺三菱製薬) final 2 U/mL 含有) で必要量の血液を採取した。

### 2) インキュベーション

3 もしくは 4 分割した被験シート 2 枚を重ねられないように 15 mL チューブに入れ、6 mL の全血 (6 cm<sup>2</sup> / 1 mL 全血) と 37°C、2 時間、緩やかに振盪 (60 rpm) した。チューブは横にして振盪し、15 分毎にチューブ回し、上下が入れ替わるようにした。

インキュベーションチューブ及びインキュベーション時間の検討においては、Polyethylene terephthalate (PET) (Corning)、polypropylene (PP) (SUMILON)、PP-low bind (SARSTEDT) を用い、その後の試験においては、PP-low bind を用いた。

### 3) サンプルング

インキュベーション開始時及びインキュベーション終了後、各試験項目に応じて血液をサンプルングした (図 2)。血液凝固因子測定用はクエン酸含有チューブ (テルモ)、血小板因子測定用は CTAD (citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole、血小板刺激抑制) 含有チューブ (BD)、補体系測定用には、Futhan (Nafamostat Mesilate (補体分解阻害剤)、鳥居薬品、final 5  $\mu$ g/mL) 添加 EDTA-2K 含有チューブ (テルモ) にサンプルングし、図 2 に示すように水中静置、遠心等の処理を行った後、分注して -30°C で保存した。溶血性試験は、全血をそのままサンプルングして用いた。

### 4) 溶血性試験

各時間にサンプルングした全血を、PBS 又は蒸留水と血液を 7:1 で穏やかに転倒混和した。750 x g で 5 分間、冷却遠心し、上清を分取した。PBS で 10 倍希釈し、576 及び 540nm の吸光度を測定した。ASTM 法ではクエン酸処理血、NIH 法ではシュウ酸処理血、MHLW 法では脱繊維血を試験に用い、先に血液を希釈後、接触試験を行い、吸光度を測定することから、本研究における結果は、参考データとした。溶血率 (%) は、(試験液上清の平均吸光度 - 陰性対照上清の平均吸光度) / (陰性対照完全溶血上清の平均吸光度 - 陰性対照上清の平均吸光度) x 100 で算出した。

### 5) 血液凝固系の測定

TAT の測定は、凍結保存したクエン酸処理血を ELISA (エンザイグノスト TAT micro、SIEMENS) により測定した。

### 6) 血小板活性化の測定

$\beta$ -TG の測定は、凍結保存した CTAD 処理血を ELISA (アセラクロム  $\beta$ -TG TMB、Roche) により測定した。

### 7) 補体系の測定

C3a、C5a、SC5b-9 の測定は、凍結保存したフサン/EDTA-2K 処理血を、ELISA により測定した。測定キットは、C3a

(MicroVue C3a plus EIA Kit、QUIDEL)、C5a (MicroVue C5a EIA Kit、QUIDEL)、SC5b-9 (MicroVue SC5b-9 plus EIA Kit、QUIDEL) を用いた。

5)～7)の ELISA による測定は、キットの添付文書に従って実施した。推奨の希釈により検量線上に値が乗らない場合は、希釈倍率を変更し再検討を行い、全サンプルを同じ希釈倍率で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト全血を用いることから、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会に申請を出し、承認を受けた上で実施した。試験に用いる材料として、本研究グループにおいて検討に用いている、既存の陽性及び陰性材料と生体適合性の優れた新規材料を用い、収集する基礎データが、新規評価手法の開発にも役立つよう配慮した。

## C. 研究結果

### 1. PC シートを用いた血液適合性試験法についての検討

陽性対照として PC シートを用い、インキュベーション時の基礎的な実験条件について検討を行なった。インキュベーションチューブの素材は、Polyethylene terephthalate (PET) 及び polypropylene

(PP) について検討を行い、PP チューブについては、市販の low protein bind tube についても比較した。インキュベーション時間は、1、2、4 時間について検討した。0 時間 (シート無し) 及び各時間インキュベーション後のサンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として  $\beta$ -

TG の測定、補体系の評価項目として SC5b-9 を測定した。表 1 に溶血試験の結果を示した。いずれのシートも溶血率は 2%以下であり、溶血性なしと判定された。ABS 540 nm においても ABS 576 nm と同様の結果が得られた (data not shown)。次に、凍結保存しておいた血液サンプルを用いて、ELISA 法により TAT、 $\beta$ -TG、SC5b-9 を測定した。

TAT では、PET、PP-low bind チューブを用いた際に、インキュベーション時間に応じた値の増加が観察された (図 3)。いずれのチューブにおいても、シート無しと PC シート有りで差が観察され、PP-low bind チューブでは、インキュベーション 4 時間目においてもシート無しで、1、2 時間とほとんど値が変わらなかった。3 種類のチューブを比較すると、インキュベーション 4 時間目では、PP チューブが、PC シート有りの値が最も高かった。

$\beta$ -TG では、PET、PP、PP-low bind チューブを用いた際に、インキュベーション時間に応じた値の増加が観察された (図 4)。 $\beta$ -TG は、インキュベーション 1 時間目で、シート無しの場合でも、0 時間に比べて値の増加がいずれのチューブにおいても観察され、PET チューブの場合には、シート無しと PC シート有りで差が殆どなかった。3 種類のチューブの結果を比較すると、インキュベーション 4 時間目の PC シート有り値は 3 種類のチューブで同程度であったのに対して、シート無しの値は PET、PP チューブに比べて、PP-low bind チューブで低かった。

SC5b-9 でも、 $\beta$ -TG 同様、PET、PP、PP-low bind チューブを用いた際に、インキュベーション時間に応じた値の増加が観察された (図 5)。SC5b-9 の値は、いずれのチューブを用いた場合も、シート無しと PC シート有りで差が僅かであった。PET チューブ

ープのインキュベーション4時間目、PPチューブのインキュベーション2、4時間目でシート無しの方が高く、PP-low bindチューブでもインキュベーション4時間目でシート無しとPCシート有りと同程度であった。

以上の結果より、今後の実験は、陰性対照（シート無し）の値が低いPP low-bindチューブを用い、インキュベーション時間を2時間に固定することにした。補体系最終活性化産物のSC5b-9について、シートの有無による差が観察されなかったことから、補体系の他の評価項目であるC3a、C5aについても検討することにした。

## 2. 混合比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体をコートしたシートを用いた血液適合性試験

試験条件についての検討結果を踏まえ、混合比の異なる 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) / 2-methoxyethyl acrylate (MEA) ランダム共重合体をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、蛋白質マーカーを指標とする各評価項目の特性について検討した。図6に、HEMA/MEA ランダム共重合体をコートしたシートの接触角を測定した結果を示した。その結果、PBS 浸漬後に測定した接触角が、未浸漬の場合と殆ど変化しておらず、コートが剥離していないことが確認できた。未浸漬、PBS 浸漬の場合共に、PHEMA で最も接触角が大きく、H75M25、H50M50、H25M75、PMEA の接触角はほぼ同じであった。PBS 浸漬の結果では、PHEMA から HEMA の混合比が減るにつれて接触角が小さくなり、H50M50 が最も小さく、さらに MEA の混合比が増えるに連れて接触角が大きくなる傾向が観察された。

血液適合性試験では、0時間（シート無し）及び2時間インキュベーション後のサ

ンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として  $\beta$ -TG の測定、補体系の評価項目として C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。試験は4回実施し、その平均を求めた。表2に溶血試験の結果を示した。いずれのシートも溶血率は2%以下であり、溶血性なしと判定された。ABS 540 nm においても ABS 576 nm と同様の結果が得られた (data not shown)。次に、凍結保存しておいた血液サンプルを用いて、ELISA 法により TAT、 $\beta$ -TG、C3a、C5a、SC5b-9 を測定したところ、TAT では、PHEMA の値が最も高く、MEA 量が添加された HEMA/MEA シートにおいては値が低かった (図7)。PHEMA の TAT の値は、他のシートに比べて高かったが、4回の試験でそのレベルに幅があった。 $\beta$ -TG では、HEMA/MEA シートにおいて MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察され (図8)、H50M50 が最も低く、H75M25、PMEA が次いで低かった。2時間のインキュベーション後、シート無しの場合でも  $\beta$ -TG の値が増加していた。

補体系の最初の活性化産物である C3a では、5種類の混合比の異なる HEMA/MEA シートにおいて殆ど差が観察されなかった (図9)。また、2時間のインキュベーション後、シート無しの場合でも C3a の値が増加していた。補体系の中間活性化産物である C5a では、HEMA/MEA シートにおいて MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察された (図10)。今回の試験で PHEMA において、シート無し及び PC シートに対して有為な増加が観察されたが、C5a のレベルは C3a、SC5b-9 に比べると低く (1/40~1/80)、0、2時間目のシート無しの値と、陽性対照シート、HEMA/MEA シートによる値との間の変化は少なかった。補体系の最終活性化産物で