

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、 β -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、 β -TG、SC5b-9 量の増加が観察された。TAT、 β -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、 β -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、 β -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、 β -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 β -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った。

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、分子動力学的シミュレーショングループの研究成果と合わせ、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 (β -トロンボグロブリン (β -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 β -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、各試験法の特長、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 β -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、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 μ L でスピコート (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 μ 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 ° 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 枚を重ねないように 15 mL チューブに入れ、6 mL の全血 (6 cm² / 1 mL 全血) と 37 °、

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 μ 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 に示すように氷中静置、遠心等の処理を行った後、分注して-30 ° 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

β -TG の測定は、凍結保存した CTAD 処理血を ELISA (アセラクロム β -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 β -

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、 β -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。

β -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)。 β -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、 β -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 β -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、 β -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。 β -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 β -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

ある SC5b-9 では、C5a 同様、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 11）。また、2 時間インキュベーション後、シート無しの場合でも、 β -TG、C3a 同様、SC5b-9 の値が増加していた。補体系の活性化産物 C3a、C5a、SC5b-9 において、陽性対照シート、HEMA/MEA シートにより、C5a、SC5b-9 の結果は似ていたが、C3a の結果は行なっており、同じ補体系の活性化マーカーでも異なる結果が得られることが示された。また、補体系の活性化産物 C3a、C5a、SC5b-9 共に、陽性対照として用いた PET、PC シートによる値の上昇が、5 種類の HEMA/MEA シートの値に比較して高いという結果は観察されなかった。

3. 新規材料による血液適合性試験

PHEMA、PMEA、PMe3A、PEOEVE、PTHFVE をコートしたシートを用いて血液適合性試験を行い、溶血性試験、血液凝固系 TAT 及び血小板活性化 β -TG を測定した。試験は 4 回実施し、その平均を求めた。表 3 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、 β -TG を測定したところ、TAT の値は、PET、PHEMA、PC、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順に値が小さくなっていった（図 12）。 β -TG の値は、PC、PET、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順で（図 13）陽性対照のシート以外の 5 種類のシートの結果は、TAT、 β -TG 共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順で、PMe3A と PTHFVE、PMEA と PEOEVE の値は同程度であった。

D. 考察

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。その「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）血液凝固の TAT、フィブリノペプチド A（FPA）、血小板の β -TG、血小板第 4 因子（PF4）、補体系の C3a、C5a、SC5b-9 の測定には免疫検定法（ELISA）が推奨されるため、使用できる動物種が限定される。これらの項目に対する ELISA キットは、ヒトの臨床検査用に開発されているものが多いことから、ヒトの血液による試験系の設定が必要になる。標準的な評価項目として挙げられている因子や活性化産物が分解しやすいなど、半減期が短いことから、それぞれの測定項目に合わせたサンプリングが必要となった。血小板因子測定用のサンプルにおいては、血中の組織因子が影響することから、臨床の測定サンプルにおいては、初めの 2 mL を捨てた後に 4.5 mL の血液をサンプリングする様指示があることから、今回の試験の実施においても、まず、初めの 3-4 mL を別の注射筒で取ってから試験用の採血を行った。この組織因子の影響を確認するため、組織因子を含む血液 6 mL を、同様に 2 時間インキュベーションし、 β -TG の値を測定したが、試験用に最初の 6 mL を取った後採取した血液（100mL 程度）による結果と差はなかった（data not shown）。このことから、少なくとも、この in vitro 評価系において β -TG を比較する場合において

は、組織因子の影響は受けないと考えられた。

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、PET、PP 及び PP-low protein bind tube について比較し、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。その結果、PP low-bind チューブを用いることにより、陰性対照（シート無し）の値が低く、陽性対照シートとの差が観察しやすいと考えられた。また、インキュベーション時間については 2 時間が適当であると考えられた。補体系最終活性化産物の SC5b-9 については、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 シートを用いた血液適合性試験

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て血液適合性試験を実施し、溶血性及び、TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 の各マーカー量を測定した結果、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9 では、HEMA/MEA シートにおける MEA 量の増加に伴って、マーカー量の減少が観察され、図 6 に示した各シートの接触角の結果とも良く相関していた。これら結果は、MEA が HEMA に比べてより血液適合性に優れているという性質と一致していた。TAT、 β -TG では、陰性対照（シート無し）に比べて、陽性対照シート（PET、PC）におけるマーカー量の増加が観察されていた。補体系マーカー（C3a、C5a、SC5b-9）に関しては、陰性対照（シート無

し）に比べて、陽性対照シート（PET、PC）で値の差が殆どなく、HEMA/MEA シートとの差も観察され難かった。以上より、高分子材料の血液適合性の評価においては、TAT、 β -TG 活性を指標とするのが適している可能性が示唆された。

β -TG の測定結果では、HEMA/MEA シートにおいて、H50M50、H25M75 は PMEa に比べて β -TG 量が減少していたことから、混合比を変化させることにより、生体適合性/血液適合性を更に向上できる可能性が考えられた。各材料の特性により、血液適合性における生体応答への影響が異なると考えられることから、メカニズムを踏まえた解析が期待される。

3. 新規材料による血液適合性試験

本年度の研究で用いた、新規材料 PMe3A、PEOEVE、PTHFVE は、いずれも PMEa の類似体である。PMe3A は、2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl acrylate と n-butyl acrylate の共重合体 (30:70 mol%) で、PEOEVE、PTHFVE は共に、PMEa のエステル部分がエーテルになった vinyl ether 構造を有している。PMe3A、PEOEVE、PTHFVE に対して血液適合性試験を実施し、TAT 及び β -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 の順に小さくなっており、PMe3A と PTHFVE、PMEa と PEOEVE の値は同程度であった。本試験の結果から推測される、血液適合性は PEOEVE = PMEa > PTHFVE > PMe3A > PHEMA の順である。PMEa と PEOEVE が同程度に低いという結果は、PEOEVE において PMEa 同様、中間水が観察され、PMEa と PEOEVE の血小板粘着量は同程度に低いという、H25 年度の本研究班の田中らの報告と、良く一致した。

本年度の研究において、補体系の C3a、C5a、SC5b-9 において HEMA/MEA シートに対する挙動が異なっていたが、血液凝固の標準的な評価項目としては TAT の他に FPA、血小板においては β -TG の他に PF4 も挙げられており、これらの項目が同程度に評価されるか確認しておく必要があると思われる。また、先に補体系による評価について述べたが、今回実施した *in vitro* 評価系では、15 mL のチューブに被験シートと血液 6 mL を入れ、緩やかに振盪しており、インキュベーション中、血液は空気と接触している。 β -TG 及び補体系マーカー C3a、C5a、SC5b-9 は、2 時間のインキュベーション後、いずれもシート無しにおいて、値が上昇していた。シート無しにおいて値が上昇していても、それをバックグラウンドとして被験材料による差をみることであれば問題ないと思われるが、今回用いた、陽性対照シート、HEMA/MEA シートでは、その差として検出することは困難で、 β -TG では、被験シートによる値が、シート無しに比べて低い場合もあった。これらの結果が、空気との接触によるものであるかは判断できないが可能性の一つとして考えられるため、空気相の影響等についての検討も含め、今後更に、各試験法の特性、妥当性について総合的に検証に向けて、基礎的データを収集する必要があると考えられる。

本研究班においては、プロテオミクス解析を利用して、材料表面吸着蛋白質を指標とした新規血液適合性マーカーの探索が進められ、幾つかの候補蛋白質が見つかってきている。これらの材料側からの評価マーカーが、*in vitro* の血液適合性試験において、血液側からも追跡できれば、評価法の効率化、新規評価手法開発に繋がるのが期待できる。

E. 結論

本研究において、

1. 陽性対照 PC シートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 β -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、 β -TG、SC5b-9 量の増加が観察された。TAT、 β -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。
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て血液適合性試験を実施し、TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 の各マーカー蛋白質量を測定した結果、TAT、 β -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、更に、TAT、 β -TG では、陽性対照シート (PET、PC) におけるマーカー蛋白産生の増加が観察された。以上より、高分子材料の血液適合性の評価においては、補体系のマーカー (C3a、C5a、SC5b-9) は適さず、TAT、 β -TG を指標とするのが適している可能性が示された。
3. 新規材料 PMe3A、PEOEVE、PTHFVE をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 β -TG の各マーカー蛋白質量を測定した結果、両マーカー共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE 順に値が小さくなっており、血液適合性は PEOEVE = PMEA > PTHFVE > PMe3A > PHEMA の順であると推察された。

今後も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。

本研究の遂行にあたり、血液適合性試験の実施方法についてご指導いただきました、

一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性学研究室の新藤智子先生に感謝致します。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Miyajima-Tabata A., Kato R., Komoriya K., Niimi S.: Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)

2) 宮島敦子、小森谷薫、田中賢、比留間瞳、加藤玲子、新見伸吾：血液適合性試験における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2014.11）

3) 加藤玲子、齋島由二、福井千恵、比留間瞳、澤田留美、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マーカーの探索、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2014.11）

4) Miyajima-Tabata A., Kawakami T., Komoriya K., Kato R., Niimi S., Isama K Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

| 試験項目 | | 評価項目 |
|------|--------|--|
| 1 | 血栓形成 | 付着物/ 付着状態 |
| 2 | 血液凝固 | トロンビン-抗トロンビン複合体(TAT) |
| | | フィブリノペプチドA (FPA) |
| | | 部分トロンボプラスチン時間(PTT) |
| 3 | 血小板 | 血小板数 |
| | | 血小板放出因子(β -トロンボグロブリン(β -TG)) |
| | | 血小板第4因子(PF4) |
| 4 | 血液学的項目 | 全血算(CBC) |
| | | 溶血 |
| 5 | 補体系 | 補体活性化産物(C3a) |
| | | 補体活性化産物(C5a) |
| | | 補体活性化産物(SC5b-9) |

「医療機器の製造販売承認申請等に必要なる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 平成24年3月1日)より

図1 血液適合性試験における標準的な評価項目

ヒト全血(ヘパリン2 U/mLを含む)と被験試料(6 cm² /1mL血液)を、37°C、2時間、緩やかに振盪(60 rpm)後、各試験項目に応じて血液をサンプリング。

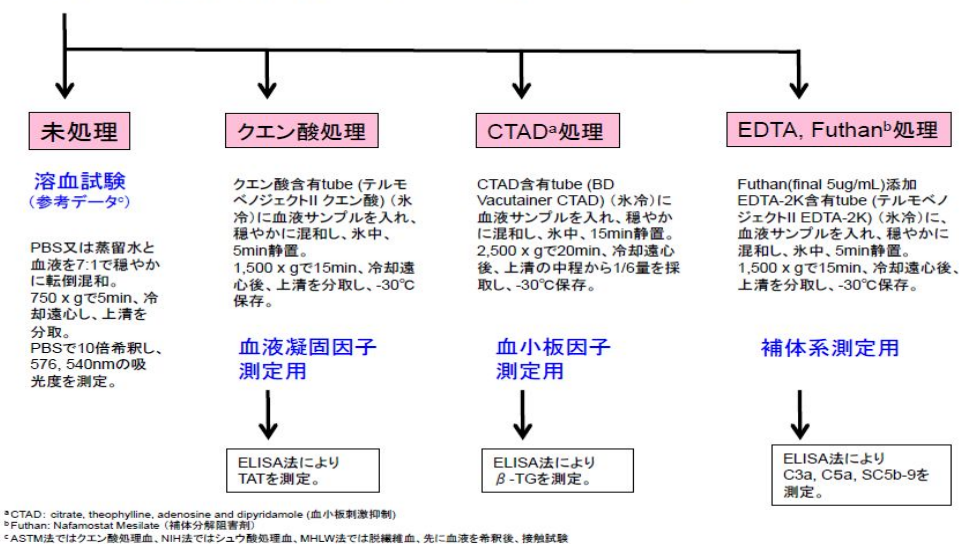


図2 血液適合性試験の実施方法の概略

表1 血液適合性試験の試験条件の検討 溶血性

| Incubation tube | Time | PC samples | ABS (576nm) mean | | 溶血率 (%) |
|-----------------|--------|------------|------------------|-------|---------|
| | | | PBS | DDW | |
| PP | 0 time | - | 0.033 | 0.809 | |
| PET | 1h | - | 0.026 | 0.835 | 0.19 |
| | 1h | + | 0.028 | 0.865 | |
| | 2h | - | 0.028 | 0.857 | 0.12 |
| | 2h | + | 0.029 | 0.863 | |
| | 4h | - | 0.030 | 0.884 | |
| | 4h | + | 0.031 | 0.824 | |
| PP | 1h | - | 0.027 | 0.866 | 0.00 |
| | 1h | + | 0.025 | 0.870 | |
| | 2h | - | 0.030 | 0.833 | 0.00 |
| | 2h | + | 0.030 | 0.957 | |
| | 4h | - | 0.029 | 0.933 | |
| | 4h | + | 0.030 | 0.903 | |
| PP-low bind | 1h | - | 0.027 | 0.881 | 0.00 |
| | 1h | + | 0.025 | 0.897 | |
| | 2h | - | 0.032 | 0.891 | 0.06 |
| | 2h | + | 0.033 | 0.906 | |
| | 4h | - | 0.032 | 0.815 | |
| | 4h | + | 0.030 | 0.877 | |

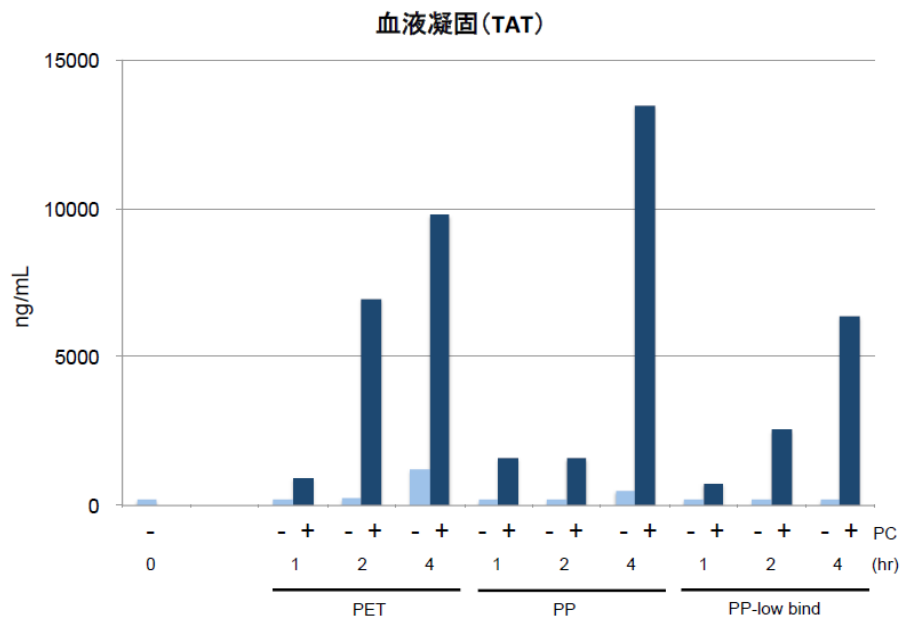


図3 血液適合性試験の試験条件の検討 血液凝固系(TAT)

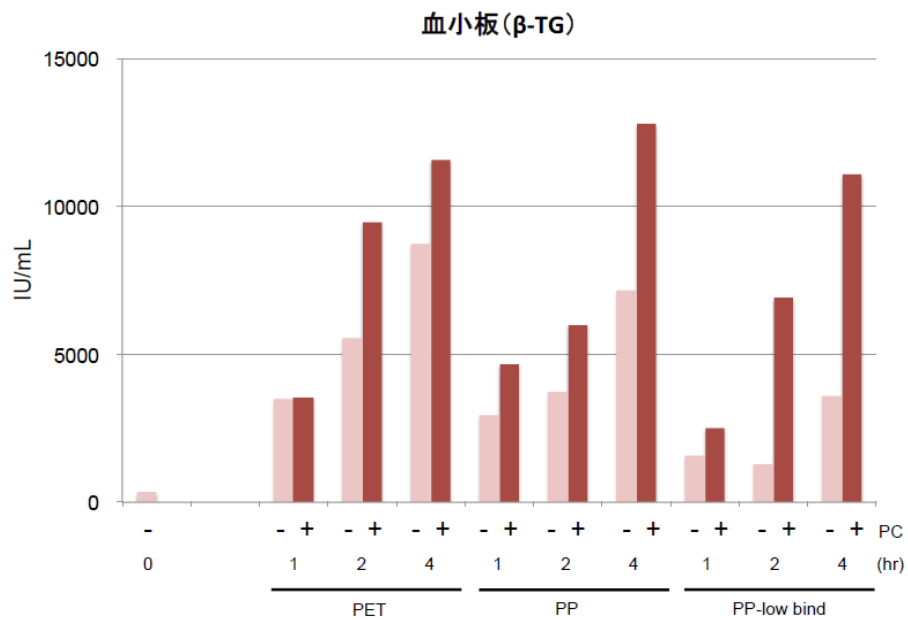


図4 血液適合性試験の試験条件の検討 血小板(β -TG)

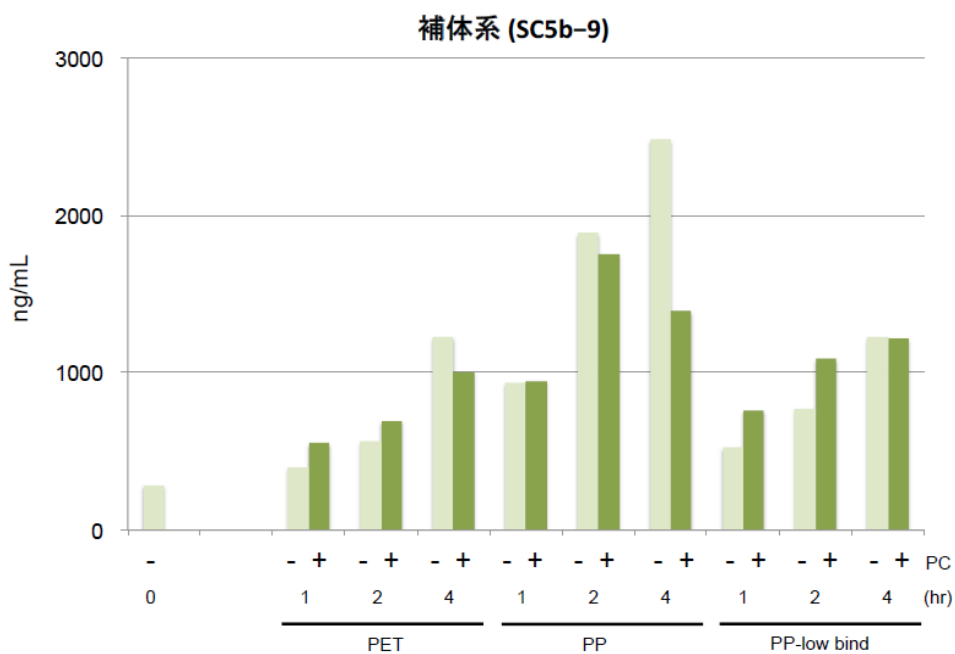


図5 血液適合性試験の試験条件の検討 補体系(SC5b-9)

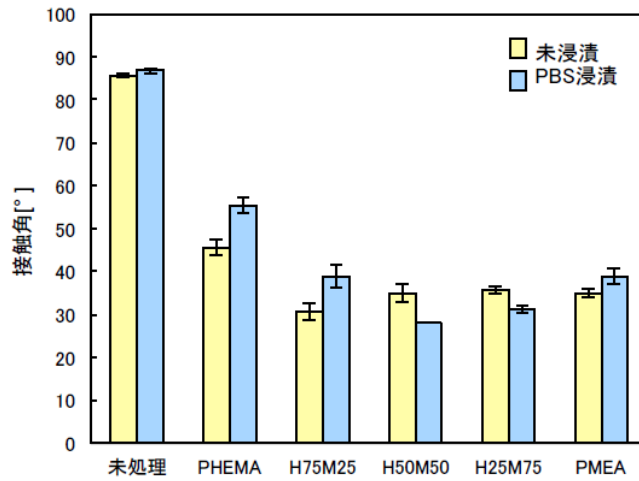


図6 混合比の異なるHEMA/MEAコポリマーコートPCシートの接触角

表2 混合比の異なるHEMA/MEAを用いた血液適合性試験における溶血率

| | ABS (576nm) (Mean ± SD) | | 溶血率 (%) |
|-------------------|-------------------------|---------------|-------------|
| | PBS | DDW | |
| 0 time (no sheet) | 0.031 ± 0.003 | 0.839 ± 0.080 | |
| no sheet | 0.032 ± 0.001 | 0.923 ± 0.033 | |
| PET | 0.032 ± 0.002 | | 0.06 ± 0.12 |
| PC | 0.033 ± 0.002 | | 0.11 ± 0.07 |
| PHEMA | 0.036 ± 0.002 | | 0.42 ± 0.27 |
| M25H75 | 0.035 ± 0.002 | | 0.35 ± 0.13 |
| M50H50 | 0.034 ± 0.002 | | 0.24 ± 0.14 |
| M75H25 | 0.034 ± 0.002 | | 0.13 ± 0.11 |
| PMEA | 0.033 ± 0.001 | | 0.28 ± 0.26 |

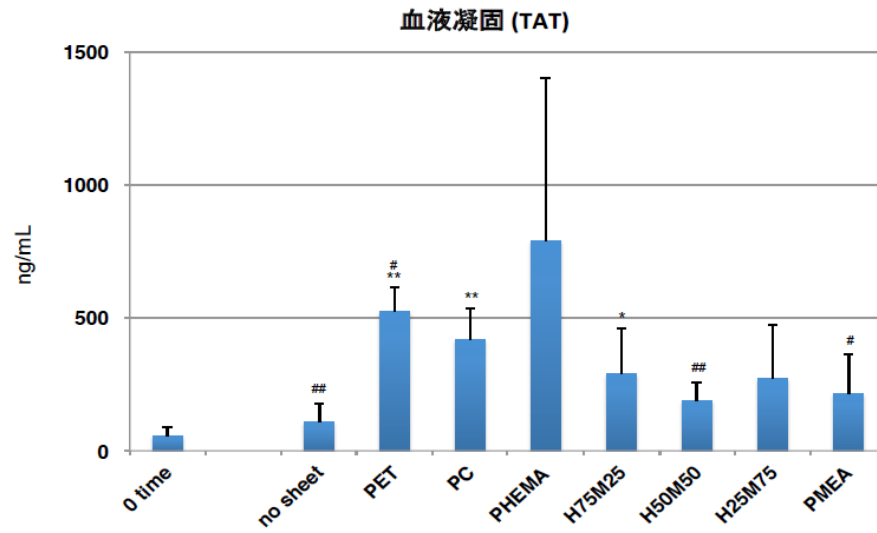


図7 混合比の異なるHEMA/MEAによる血液凝固系(TAT)の活性化

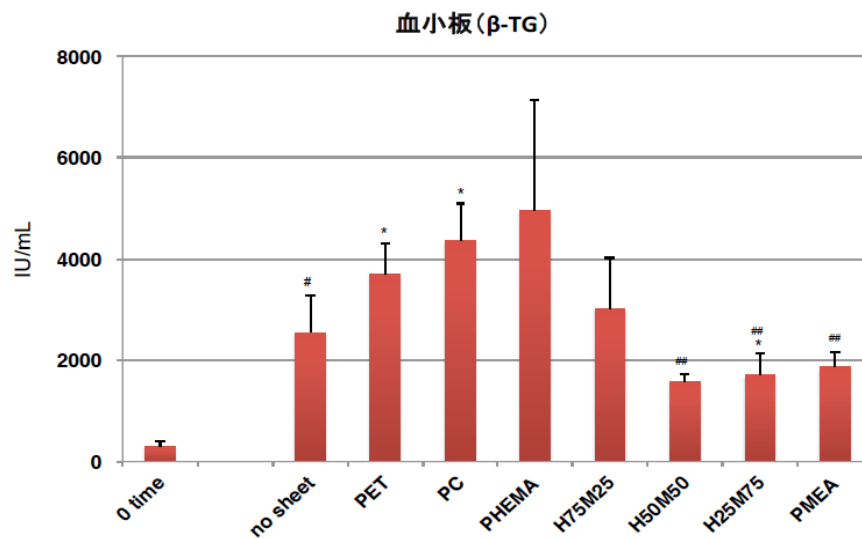


図8 混合比の異なるHEMA/MEAによる血小板(β -TG)の活性化

Valures are expressed as mean \pm SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and PC are shown as # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

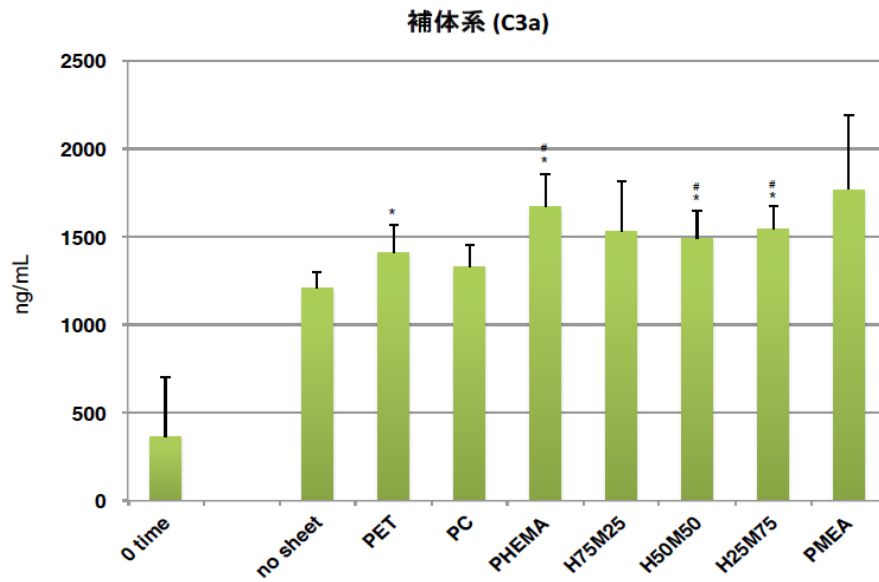


図9 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C3a)の活性化

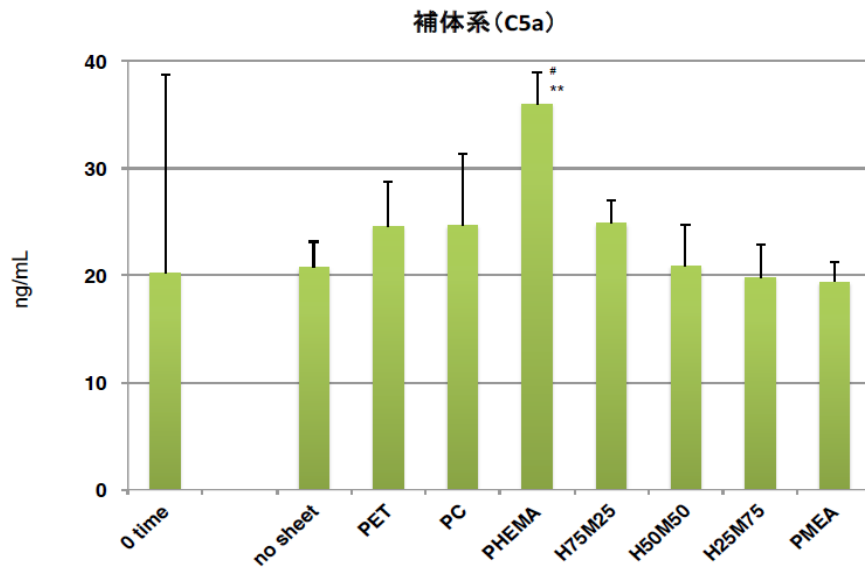


図10 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C5a)の活性化

Values are expressed as mean ± SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as *p < 0.05, **p < 0.01 and PC are shown as #p < 0.05.

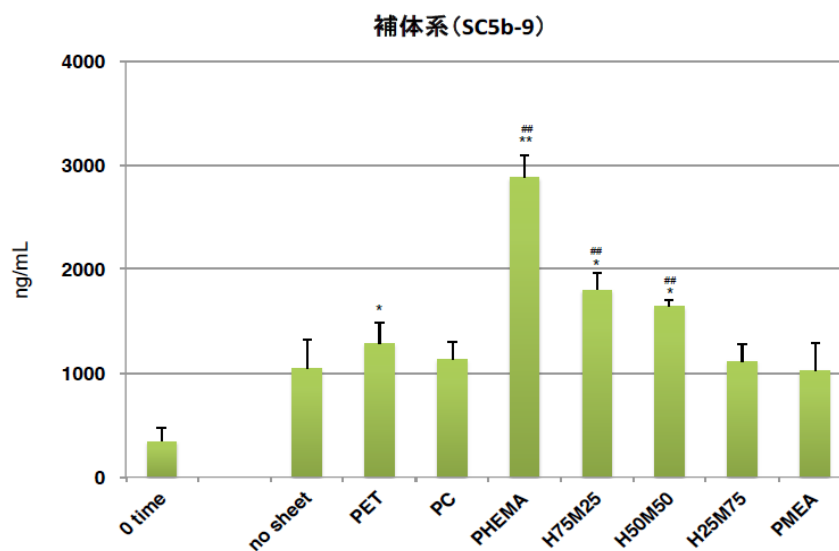


図11 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(SC5b-9)の活性化

Values are expressed as mean \pm SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as *p < 0.05, **p < 0.01 and PC are shown as ##p < 0.01.

表3 新規材料を用いた血液適合性試験における溶血率

| | ABS (576nm) (Mean \pm SD) | | 溶血率 (%) |
|-------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------|
| | PBS | DDW | |
| 0 time (no sheet) | 0.033 \pm 0.004 | 0.915 \pm 0.053 | |
| no sheet | 0.029 \pm 0.003 | 0.916 \pm 0.061 | |
| PET | 0.027 \pm 0.004 | | 0.09 \pm 0.19 |
| PC | 0.028 \pm 0.005 | | 0.06 \pm 0.12 |
| PHEMA | 0.030 \pm 0.003 | | 0.15 \pm 0.23 |
| PMEA | 0.030 \pm 0.002 | | 0.19 \pm 0.28 |
| PMe3A | 0.029 \pm 0.004 | | 0.10 \pm 0.12 |
| PEOVEE | 0.030 \pm 0.005 | | 0.21 \pm 0.35 |
| PTHFVE | 0.031 \pm 0.003 | | 0.24 \pm 0.28 |

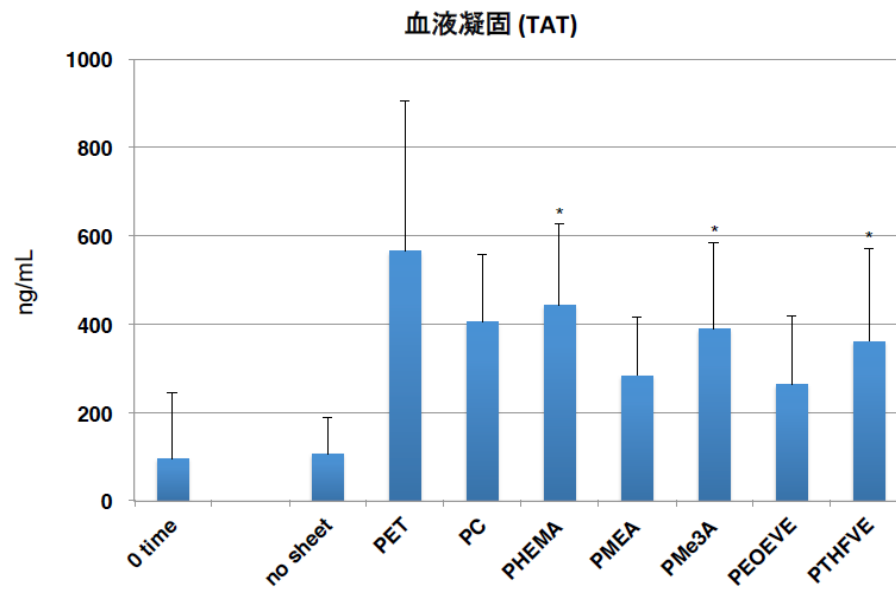


図12 新規材料による血液凝固系(TAT)の活性化評価

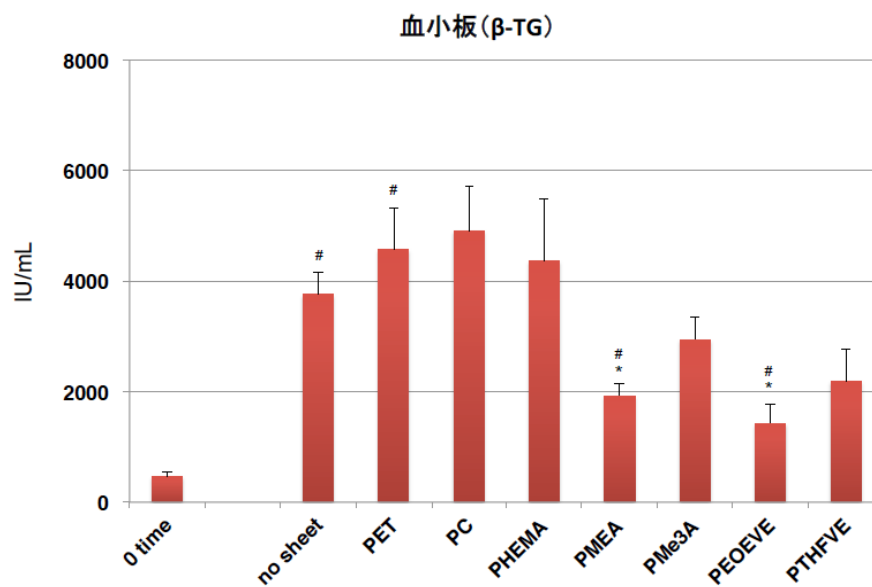


図13 新規材料による血小板(β-TG)の活性化評価

Values are expressed as mean ± SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as *p < 0.05 and PC are shown as #p < 0.05.