

する蛋白質群中、ANT3、PLGB 及び PLMN は幾つかの PSF 材料上で濃縮されたが、これらの蛋白質は血液凝固を抑制する線溶系蛋白質であると共に、その他の多くの材料への顕著な吸着が認められなかった。血小板 α 顆粒成分である A1AT は、Mascot score 及び Peptide count とともに高く、その同定は確かであるが、各材料上で濃縮されなかった。また、カリクレイン・キニン群として同定された KNG1 も、PSF3-5 を除き、対照材料を含めた多くの材料上で濃縮されなかったことから、これらの蛋白質もマーカ候補から除外した。

(3) 血液適合性評価マーカの検証

2-1. 標的プロテオミクス

23 種類の材料に吸着する血漿蛋白質を試料として、13 種類の血液適合性評価マーカ候補蛋白質（ペプチド）を SRM 解析により絶対定量した。各ペプチドの分離状況は良好であり、各検量線の相関係数は 0.9966 から 1.0000 であり、いずれのペプチドともに低濃度領域から高濃度領域まで良好な相関が得られた。また、各トランジットイオンの定量・定性用チャンネルのイオン検出状況も良好であった。

MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っており、特に C1s と VTNC の吸着量は MEA/HEMA 系材料とその他の材料間で大きく異なることが確認されたことから、これらの 5 種類の蛋白質は血液適合性評価マーカとして利用できることが示唆された。MEA/HEMA 系材料表面への FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 吸着量も、その他の材料を下回っていたが、MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若干存在した。また、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は偽陰性を示す材料が存在したが、最も良好な血液適合性を有すると思われる PMEa を基準とした場合は、C1r、C3、FHR1 も評価マーカとして利用できる可能性が示唆された。

2-2. 過去の報告との相関性評価

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。従来の金属ステントのプラットホームは SUS、Co-Cr、Ni-Ti 等の金属から構成されている。一方、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。

DLC は低摩擦や低摩擦、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った。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。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。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。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。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。

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、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* 血小板吸着試験やミニブタを使用した *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。

(4) 新規高分子材料の血液適合性への応用

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、F1NC 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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表等

<誌上発表>

- 1) Haishima Y, Isama K, Hasegawa C, Yuba T and Matsuoka A. 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. Part A*, 101:2630-2643 (2013).
- 2) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y and Matsuoka A. Calcium-incorporated titanium surface influence the osteogenic

- differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 101: 2573-2585 (2013).
- 3) Hoshino T, Narukawa Y, Haishima Y, Goda Y and Kiuchi F. Two new sulfated oleanan saponins from *Achyranthes* root. *J. Nat. Med.*, 67:386- 389 (2013).
- 4) 中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子. ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131:50-57 (2013).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 齋島由二. 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).
- 8) 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, 齋島由二. 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).
- 9) 中岡竜介, 齋島由二, 新見伸吾. 医療機器・材料の国際標準化動向. *バイオマテリアル生体材料*, 33(1):56-63 (2015).
- 10) 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).

<学会発表>

- 1) 齋島由二. 第7部: 発熱性物質試験. 説明会: 医療機器の生物学的安全性評価に関連する規格等の最近の改正について (2012年5月・東京).
- 2) 齋島由二. 第7部: 発熱性物質試験: 各試験法の特徴と操作方法等について. 医療機器の生物学的安全性試験法講習会 (2012年9月・東京).
- 3) 齋島由二, 福井千恵, 柚場俊康, 松岡厚子. 溶血性試験用陽性対照材料の開発と性能評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 4) 齋島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 伊佐間和郎, 松岡厚子. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: 可塑剤溶出量と溶血性の関係について. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 5) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料の表面

- 近傍における水和状態のシミュレーション的評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 6) 迫田秀行, 靛島由二, 松岡厚子. スクアレンによる超高分子量ポリエチレンの劣化機構に関する検討. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 7) 河野 健, 澤田留美, 伊佐間和郎, 靛島由二, 松岡厚子. チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 8) 靛島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 伊佐間和郎, 松岡厚子. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: 可塑剤溶出量と溶血性の関係について. 日本薬学会第 133 年会 (2013年3月・横浜).
- 9) 靛島由二, 澤田留美, 福井千恵, 松岡厚子. 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 蛋白質発現の網羅的解析による検討. 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013年3月・横浜).
- 10) 澤田留美, 靛島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子. 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 遺伝子発現の網羅的解析による検討. 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013年3月・横浜).
- 11) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, and Matsuoka A. The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (Jun., 2013 in Boston).
- 12) 植松美幸, 靛島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析 (第 2 報). 第 42 回医用高分子シンポジウム (2013年7月・青海).
- 13) 靛島由二, 福井千恵, 長部真博, 上野良之, 菅谷博之, 柵橋一裕, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾. ポリスルホン材料表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: PVP 含量と血液適合性の相関性について. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 14) 靛島由二, 福井千恵, 田中 賢, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾. HEMA/MEA ランダム共重合体表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: 血液適合性評価マーカの選定について. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 15) 野村祐介, 河上強志, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 犬飼香織, 竹ノ内美香, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 新見伸吾, 靛島由二. 溶血性試験用陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シートの性能評価. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 16) 加藤玲子, 靛島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 17) 植松美幸, 靛島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 瀬川勝智, 中野達也. 血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 18) 中岡竜介, 比留間 瞳, 靛島由二, 新見伸吾. SAM を利用したベタイン構造模倣表面調製とその構造に関する研究. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 19) 中村里香, 靛島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 安達玲子, 手島玲子. 加水分解小麦 (グルパール 19S) に特異的に発現するペプチドの探索及び同定. 第 50 回全国衛生化

- 学技術協議会年会 (2013年11月・富山).
- 20) 齋島由二, 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).
- 21) 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野 健, 野村祐介, 新見伸吾. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価. 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月・京都).
- 22) Uematsu M, Haishima Y, Nakaoka R, Niimi S, Segawa K, and Nakano T. A novel evaluation methodology of materials for medical devices based on molecular dynamics simulation. The 15th International Conference on Biomedical Engineering (Dec., 2013 in Singapore).
- 23) 植松美幸, 齋島由二, 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).
- 24) 中岡竜介, 齋島由二, 新見伸吾. 橋渡し研究及び国際標準化の行政的支援. 第 53 回日本生体医工学会大会 (2014 年 6 月・仙台).
- 25) 齋島由二, 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).
- 26) 齋島由二, 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).
- 27) 齋島由二, 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).
- 28) 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, 齋島由二. 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).
- 29) 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, 齋島由二. 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).
- 30) 加藤玲子, 齋島由二, 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).
- 31) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 分子動力学的シミュレーションによる PMEA 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).
- 32) 迫田秀行, 柚場俊康, 向井智和, 新見伸吾, 齋島由二. 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).
- 33) 齋島由二. 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).

- 34) 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) 特願 2013-104082 (平成 25 年 5 月 16 日) 「血
液バッグ」. 発明者: 齋島由二, 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.
- 2) 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.

（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 酒井 恵子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
中岡 竜介 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。本研究では、平成 24 年度に、チタン系金属、合成高分子材料を培養基質として、様々な培養細胞株を用い、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について基礎的な検討を行った。純チタン (Ti) ディスクを用いて CHL 細胞の増殖、細胞毒性、遺伝毒性について検討した結果、純 Ti 上で観察されたコロニーは、対照プレートに比べてコロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかったが、いずれの場合も感受性に差はなかった。MPC ポリマーコートプレートに CHL、A549、RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した結果、CHL 細胞はスフェロイドを形成し、A549 及び RAW264.7 細胞はブドウ塊状に増殖した。細胞毒性では、細胞株により被験物質に対する感受性に差がみられた。CHL 及び A549 細胞の遺伝毒性には差がなかった。混合比の異なる HEMA/MEA シートでは、PHEMA を除くシートで実施した CHL 細胞増殖試験において、HEMA/MEA シート間で増殖に差がなかった。

平成 25、26 年度の研究においては、血液適合性試験の各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、生体適合性の異なる高分子材料を用いて実際に血液適合性試験を行なった。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、各マーカー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、マーカー量の増加が観察された。混合比の異なる HEMA/MEA 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産生の減少が観察された。TAT、 β -TG では、対照シート (PET、PC) におけるマーカー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。チタン系金属は、強度、軽さ、耐食性、耐熱性を備え、アレルギー性も低く、優れた生体適合性を有することから、医用材料として汎用されている。一方、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer (MPC ポリマー)、poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)等の生体適合性を有する合成高分子材料は、蛋白質、ペプチドに対する吸着抑制、細胞接着抑制能を示すことから、人工臓器、血液接触医療用チューブ、カテーテル、コンタクトレンズ等の医療機器に応用されている。一方、チャイニーズ・ハムスター由来線維芽細胞株 (CHL) は、医薬品、化学物質、医療機器等の安全性評価に長年使用されており、細胞毒性、遺伝毒性に関する多くのデータの蓄積を有している。平成 24 年度の研究では、チタン系金属、合成高分子が、培養基質として、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について、基礎的な検討を行った。さらに、CHL 細胞に加えて、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549、マウス由来マクロファージ系細胞株 RAW 264.7 等の培養細胞株を用い、合成高分子基質上における細胞毒性の感受性について、比較検討を行った。

平成 25 年度より、医用材料の血液適合性に焦点絞った研究を開始した。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、図 12 に示すように、平成 15 年 2 月に発出された「医療用具の製造（輸

入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」（厚生労働省 薬食機発 0213001 号 通知）、平成 15 年 3 月に発出された「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」（医療機器審査 No.36 事務連絡）に基づいて、長年、生物学的安全性試験が実施されてきた。この事務連絡中で、血液適合性試験においては ISO 10993-4(1992)、ISO/DIS 10993-4(2000)、ASTM F756-93 が引用規格にされており、評価概要、溶血性試験、試料の調製法について言及されていた。これらの通知及び事務連絡に対して見直しが進められ、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。血液適合性試験に関しては、2002 年に発行された ISO 10993-4 (Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4, Selection of Test for Interactions with Blood) 本体及び 2006 年に発行された Amendment が、国際的な規格となっているが、2009 年より改訂作業が進められている。本邦において平成 24 年発出された第 20 号通知では、この ISO 10993-4(2002) /Amd.1(2006)及び ASTM F756-08 が、引用規格となっている。これらの通知、規格において、試験について詳細な方法が規定されているのは、赤血球に対する影響を評価する試験法である溶血性試験についてであり、その他の評価項目については、詳細は規定されていない。溶血性試験についても、米国で規格化された NIH 法、ASTM 法及び日本の MHLW 法の 3 種の試験法が存在し、試験法により判定に差が生じる例もあり、国際的にみても整備されていない状況にある。溶血性試験については、ISO 10993-4 の改訂作業の一部として、

ISO/TC194 WG9 が主体となって、溶血性試験のラウンドロビン試験が進められている。平成 24 年 厚労省発出の第 20 号通知「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 13）。これらの項目の中から、製品の用途、血液との接触期間等に応じて選択、実施されている。特に、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。

平成 25 年度は、血液適合性試験の各評価項目に関する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行った。平成 26 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) 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、PHEMA、PMEA と共に血液適合性試験を行い、血液適合性を評価した。

B. 研究方法

1. 材料

1) 純チタン (Ti) ディスク

純 Ti ディスク (33.5 mm ϕ x 2 mm (表面研磨仕上げ Ra = 0.4 程度)、ナカシマメディカル(株)) を用いた。

2) 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer コートプレート (MPC プレート)

MPC プレートとして、LIPIDURE[®] コートプレート (サーモフィッシュャーサイエンティフィック(株)) の 6-well または 96-well プレートを用い、対照として、Nunc 社のプレートを使用した。

3) 合成高分子材料

Pre-coated PET シート (34 mm ϕ 、厚さ 0.1mm、三菱樹脂、H24 年度) または、Polycarbonate (PC) シート (34 mm ϕ 、厚さ 0.1mm、菅原工芸、H25、26 年度) に、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) : 2-

methoxyethyl acrylate (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 $^{\circ}$ 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. 細胞株および培養方法

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 CHL は、国立衛研で樹立された株で基盤研の JCRB 細胞バンク (吹田)、American Type Culture Collection (ATCC) (USA)にも登録され、遺伝毒性試験に汎用されている。A549 はヒト肺由来細胞株で、JCRB 細胞バンク (吹田) より購入した。

RAW264.7 細胞はマウスの単球性白血病由来のマクロファージ系細胞株で、International Alliance for NanoEHS Harmonization (IANH)より入手した。

CHL 細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、penicillin-streptomycin を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO)にて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。A549 細胞は、10% 非働化 FBS、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO)を含む MEM にて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。RAW264.7 細胞は、10% 非働化 FBS、2 mM L-glutamine (GIBCO)、penicillin-streptomycin を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO)にて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。各細胞株は、3-4 日ごとに継代した。

3. 純 Ti ディスクを用いた試験

1) 細胞増殖試験

35 mm ϕ プレート (IWAKI) に純 Ti ディスクを配置し、CHL 細胞を播種 (2 \times 10⁴ cells/ 2 mL) し、4 日間に渡って細胞数をカウントした。

2) 細胞毒性試験・コロニー法

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、100 個の CHL 細胞を 35 mm ϕ プレートに配置した純 Ti ディスク上及び、対照の 35 mm ϕ プレートに播種し、翌日、被験液 (金属化合物) を添加後、さらに 5 日間または 7 日間静置培養した。その後、ギムザ染色してコロニーを計測し、陰性対照群のコロニー数に対する割合 (コロニー形成率) を算出した。

3) 遺伝毒性試験・in vitro 小核試験

CHL 細胞を 35 mm ϕ プレートに配置した純 Ti ディスク上及び、対照の 35 mm ϕ プレートに播種 (3 \times 10⁴ cells/ 2 mL) し、

翌日、被験液を添加して 48 時間培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、低張処理、固定処理を行い、小核観察用標本作製した。標本はアクリジン オレンジで染色し、核及び細胞質を蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) (Kyowa Hakko Kirin) を用いた。

4. MPC プレートを用いた試験

1) 細胞増殖試験

6-well MPC プレートに、CHL、A549、RAW264.7 細胞を播種 (2×10^4 cells/2 mL) し、1 週間に渡って、形態観察及び細胞数をカウントした。対照として、Nunc 社の 6-well プレートを用いた。

2) 細胞毒性試験・ATP 法

CHL 細胞 (10×10^4 cells/well)、A549 細胞 (0.5×10^4 cells/well) 及び RAW264.7 細胞 (10×10^4 cells/well) を、96-well MPC プレートに播種し、24 時間後に被験液 (金属化合物) を添加し、さらに 6 時間及び 24 時間培養した。細胞を蛍光測定用の白色プレートに移し、CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (ATP 試薬, Promega) を添加し、遮光、室温で 45 分または 90 分間反応させた。発光シグナルをルミノメーターで測定した。対照として、Nunc 社の白色 96-well プレートに細胞を播種して同様の試験を行った。

3) 遺伝毒性試験・in vitro 小核試験

CHL 細胞及び A549 細胞を 6-well MPC プレート及び対照 Nunc 社プレートに播種 (3×10^4 cells/2 mL) し、翌日被験液を添加して 48 時間培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、低張処理、固定処理を行い、小核観察用標本作製した。標本はアクリジン オレンジで染色し、核及び細胞質を蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質として MMC を用いた。

5. HMEA/MEA シートを用いた試験

1) 培地浸漬試験

6-well プレート (Costar) に、5 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートを設置し、UV 滅菌 (5 min x 2) した。PBS または MEM 培地を 3 mL/well 添加し、一晚 CO₂ インキュベーターでインキュベートした。翌日シートを取り出し、水洗 3 回後風乾した。シート表面を SEM により観察した。

2) 細胞播種試験

6-well プレートに、5 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートを設置し、UV 滅菌 (5 min x 2) した。培地 3 mL を添加し、シート裏面の気泡を除去した。培地を除去し、シートを 6-well プレートに密着させた後、CHL 細胞液 (3×10^5 cells/3 mL) をシート全体に播種し、一晚培養した。形態観察後、シート上、6-well プレート上、培養上清に分けて細胞を回収し、細胞数を計測した。対照として、Costar 社の 6-well プレートに細胞を播種した。細胞回収後のシートは、水洗 3 回後風乾し、シート表面を SEM により観察した。

1) 細胞増殖試験

6-well プレートに、HMEA/MEA シート及び未コートシートを設置、UV 滅菌 (5 min x 2) した。培地 3 mL を添加し、シート裏面の気泡を除去した。培地を除去し、シートを 6-well プレートに密着させた後、CHL 細胞液 (3×10^5 cells/3 mL) をシート中心部に播種した。6-well プレートを 30 分間クリーンベンチ内で静置した後、CO₂ インキュベーターで培養した。4 日間に渡って、形態観察、細胞数を計測した。対照として、Costar 社の 6-well プレートに細胞を播種した。

6. 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°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 14）。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 µg/mL) 添加 EDTA-2K 含有チューブ（テルモ）にサンプルングし、図 14 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°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

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. 純 Ti ディスクを用いた試験

純 Ti 上における CHL 細胞の増殖は、対照プレートと同様であった (図 1)。コロニー形成については、純 Ti 上で観察されたコロニーは、対照プレートに比べてコロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかった (図 2)。細胞毒性試験の IC_{50} 値は、 $CdSO_4$ 処理では、 $4.5 \mu M$ (control) 及び $7.3 \mu M$ (Ti)、 ZnO 処理では、 $14.2 \mu g/mL$ (control) 及び $15.5 \mu g/mL$ (Ti) で、対照プレートと比べて細胞毒性に大きな差はなかった (図 3)。次に、CHL 細胞を用いた小核試験により遺伝毒性について検討した結果、小核の出現頻度 (MN-total) は、未処理では 0.9% (control), 1.2% (Ti)、MMC 処理では 26.3% (control), 26.3% (Ti) で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった (表 1)。また M 期の細胞の割合 (MP)、多核細胞の割合 (Multi-N)、変形核の割合 (TF-N) も、未処理、MMC 処理で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

2. MPC プレートを用いた試験

MPC プレートに CHL, A549, RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した。その結果、CHL 細胞では、細胞播種数時間後、幾つかの細胞同士が凝集し、その後、数十～数百個の細胞からなるスフェロイドを形成した (図 4)。スフェロイド形成後の倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く 3~4 日で定常期となった (図 5)。これに対して、A549 及び RAW264.7 細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した

(図 6, 8)。倍加時間は、A549 細胞では対照プレートの約 4 倍で (図 7)、RAW264.7 細胞では、どちらのプレートにおいても同じ程度であった (図 9)。次に、MPC プレートを用い $CdSO_4$ 、 ZnO に対する細胞毒性について検討した結果を表 2 に示した。 $CdSO_4$ に対する毒性は、CHL 及び A549 細胞で MPC プレートの方が対照プレートに比べて弱く、 ZnO に対する毒性は、A549 細胞で MPC プレートの方が対照プレートに比べて強く、細胞株により、被験物質に対する感受性に差がみられた。

次に、CHL 及び A549 細胞細胞を MPC プレートで培養し、小核試験により遺伝毒性について検討した (図 10)。その結果、小核の出現頻度 (MN-total) は、CHL 細胞では、未処理 0.9% (control), 1.4% (MPC)、MMC 処理 ($0.1 \mu g/mL$, 48h) 10.4% (control), 10.1% (MPC)、A549 細胞では、未処理 2.6% (control), 3.3% (MPC)、MMC 処理 ($0.1 \mu g/mL$, 48h) 5.6% (control), 8.5% (MPC) で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった (表 3)。また、MP、Multi-N、TF-N の頻度も、未処理、MMC 処理で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

3. HEMA/MEA シートを用いた試験

1) 培地浸漬試験

6-well プレートに、5 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートを設置し、UV 滅菌後、PBS または MEM 培地を添加し、一晚浸漬試験を行った。翌日シートを水洗、風乾後、シート表面を SEM により観察した結果、PHEMA では、PBS、MEM 培地ともに、コートの剥離 (ポリマーが膨潤後、破裂した跡) が観察された (data not shown)。

2) 細胞播種試験

HEMA/MEA シートに CHL 細胞を播種し、一晚培養した。その結果、PHEMA で

は、コート剥離が観察され、細胞はシート上面の所々に塊になって接着し、それ以外はシートの十字部分（スピンコート跡）に接着していた。他の混合比の HEMA/MEA シートでは、対照に用いた 6-well プレートと同様に細胞が全体に接着していた (data not shown)。培地浸漬試験（一晚）の時と同様、PHEMA では、コート剥離が観察された。H75M25、H25M75、PMEA では、表面の所々にポリマーの膨潤が観察された。以上の結果より、以降の実験では、PHEMA は除外することにした。

3) 細胞増殖試験

PHEMA を除いた 4 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートに CHL 細胞を播種し、細胞増殖試験を行った。CHL 細胞液はシート中心部に播種し、細胞がシートの端から 6-well プレートにできるだけこぼれないよう、プレートを 30 分間クリーンベンチ内で静置してから CO₂ インキュベーターに移した。細胞増殖は、いずれの混合比においても、対照の 6-well プレート上と同じ程度であった (図 11)。細胞は、播種したシート中心付近で 2-3 日目に既に密になっており、周辺部に増殖が広がっていった。6-well プレート端にシートからこぼれた細胞は 5 - 10% 程度で、そのままプレートの端周辺で増殖していた。

4. 血液適合性試験の予備試験

平成 25 年度は、血液適合性試験について、各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、次に高分子材料に対して、実際に血液適合性試験を実施した。予備試験では、PET、PC (未コート)、PHEMA、PMEA、MPC シートについて血液適合性試験を実施し、0 時間（シートなし）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 及び SC5b-9 の測定を行なった。予備試験の結果、被験シートを用いて血液適合性試験の各試験項目測定が可能であることが分かったので、サンプル数を増やして血液適合性試験を実施した。

5. PC シートを用いた血液適合性試験法についての検討

平成 26 年度は、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)、polypropylene (PP) 及び PP-low protein bind tube について比較した。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、TAT、 β -TG、SC5b-9 を測定した。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 (data not shown)。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 15)。いずれのチューブにおいても、シート無しと PC シート有りでは差が観察され、PP-low bind チューブでは、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、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 16)。 β -TG は、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、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 17)。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しかなく、においては PET チューブのインキュベーション 4 時間目、PP チューブの 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 4 時間目でシート無しと PC シート有りではほぼ同じ値であった。

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。

6. 混合比の異なる HEMA/MEA 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 HEMA/MEA 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 18 に、HEMA/MEA 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。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。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 (data not shown)。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 19)。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 20)、H50M50 が最も低く、H75M25、PMEA が次いで低かった。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 β -TG の値が増加していた。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 21)。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。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 22)。C5a は 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 23)。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、 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。

7. 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。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 (data not shown)。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 24)。 β -TG の値は、PC、PET、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順で (図 25)、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

1. 純 Ti ディスクを用いた試験

純 Ti ディスクを用いて細胞の増殖について検討した結果、純 Ti 上の CHL 細胞のコロニー形成は、対照プレートに比べて、コロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかったが、細胞増殖試験においては、両者における増殖曲線はほぼ同様であった。このことから純 Ti 上では、細胞密度が低い場合には、細胞増殖サイクルへの進行が遅れる可能性が示唆されたが、細胞密度がある程度以上であれば、細胞増殖の速度は、純 Ti 上においても培養プレートと同程度

であると考えられた。CdSO₄、ZnO に対する細胞毒性を検討した結果、IC₅₀ 値は、対照プレートと差はなく、また、小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC 処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかったことから、純 Ti 上で培養したことによる、細胞毒性、遺伝毒性への影響はないと考えられた。

2. MPC プレートを用いた試験

MPC プレートに CHL、A549、RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した結果、CHL 細胞はスフェロイドを形成して増殖したが、A549 及び RAW 264.7 細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した。スフェロイドを形成した CHL 細胞の場合には、細胞播種後時間後、幾つかの細胞同士が凝集し、数日掛けて数十～数百個の細胞からなるスフェロイドまで成長し、その後スフェロイドが合体する像が観察された。そのため、初めの数日間の細胞倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く 3～4 日で定常期となった。これは、スフェロイドの成長に伴い、スフェロイドの中心部にある細胞への酸素や栄養分の供給が不十分になるためであると考えられた。これに対して、A549 及び RAW264.7 細胞では、スフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖したが、その倍加時間は、RAW264.7 細胞ではどちらのプレートにおいても同じ程度であったのに対して、A549 細胞では対照プレートの約 4 倍であった。RAW264.7 細胞はマクロファージ様細胞株で、活性化マクロファージになっていない通常の増殖状態においては細胞の接着性が弱く、継代の際にもトリプシン処理ではなくピペティングにより細胞を剥がすことができるほどである。そのため MPC プレート上においても、対照プレートと変

わらない倍加時間で増殖したと考えられる。それに対して、A549 細胞は接着細胞であり、A549 細胞の増殖が、細胞接着に大きく依存しているために MPC プレート上での倍加時間が遅くなったと考えられた。本研究では 3 種類の細胞を MPC プレート上で培養したが、細胞により形態、増殖がそれぞれ異なっていたのは興味深い知見であった。特に、同じ接着タイプの CHL 及び A549 細胞で増殖形態に差が生じた理由については、細胞表面の蛋白、接着因子、構造因子等が異なっているためであることが予想され、今後、他の細胞についても検討を広げ、詳細な解析を進めることにより、有用な情報が得られることが期待される。さらに、MPC プレートを用いて細胞毒性を比較した結果、細胞株により、被験物質に対する感受性に差がみられた。これは、MPC プレート上での細胞の形態、増殖の差が関わっていると考えられた。MPC プレート上で、CdSO₄、ZnO に対する毒性が異なったことは、被験物質の物性との関連が予想されるが、そのメカニズムを明らかにできれば、合成高分子等の医用材料の安全性評価の上で、有用な知見となると思われる。

3. HEMA/MEA シートを用いた細胞増殖試験

HEMA/MEA シートを用いた試験については、培地浸漬試験、細胞播種試験を実施した後、培地浸漬試験でコート剥離（ポリマーが膨潤後、破裂した跡）が観察された PHEMA 以外の HEMA/MEA シートにより、CHL 細胞を用いて細胞増殖試験を行なった。CHL 細胞液はシート中心部に播種し、細胞がシートの端から 6-well プレートにできるだけこぼれないよう、プレートを 30 分間クリーンベンチ内で静置してから CO₂ インキュベーターに移した。細

胞増殖は、いずれの混合比においても、対照の 6-well プレート上と同じ程度で、HEMA/MEA の混合比により、細胞増殖に影響はないと考えられた。

4. 血液適合性試験の予備試験

平成 25 年度より、医用材料の血液適合性に焦点絞った研究を開始した。血液適合性試験の実施において標準的な評価項目として挙げられていたもののうち、TAT、FPA、 β -TG、PF4、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 キットが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。図 14 に示すように、血液凝固因子測定用にはクエン酸処理、血小板因子測定用には CTAD 処理、補体系測定用には EDTA、Futhan 処理を行ったサンプルを用いて測定を行った結果、実際にこれらの処理により ELISA で検出可能で、各因子や活性化産物が分解していないことが確認でき、また、被験試料により値に差を観察することができた。

5. 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。

6. 混合比の異なる HEMA/MEA をコートした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。

7. 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。

平成26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事ができ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、各試験法の特長、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事が期待できる。

E. 結論

平成24年度研究においては、チタン系金属、合成高分子材料を培養基質として、様々な培養細胞株を用い、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について基礎的な検討を行った。

1) 純Ti ディスク

CHL細胞を用いて、細胞増殖、細胞毒性及び遺伝毒性について検討した結果、細胞増殖は、対照プレートと同様であった。コロニー形成については、純Ti上では対照プレートに比べてコロニーの大きさが小さく、数も若干少なかった。CdSO₄、ZnO

に対する細胞毒性を検討した結果、対照プレートと比べて細胞毒性に大きな差はなかった。小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

2) MPC ポリマープレート

CHL, A549, RAW264.7細胞を用いて、細胞増殖、細胞毒性及び遺伝毒性について検討した結果、CHL細胞はスフェロイドを形成し、倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く3~4日で定常期となった。これに対して、A549及びRAW264.7細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した。倍加時間は、RAW264.7細胞では、どちらのプレートにおいても同じ程度であったが、A549細胞では対照プレートの約4倍であった。

CdSO₄、ZnOに対する細胞毒性について検討したところ、CHL及びA549細胞では、CdSO₄の毒性はMPCプレートの方が対照プレートに比べて弱く、RAW264.7細胞では、両プレート間で大きな違いはなかった。ZnOに対する毒性は、A549及び

RAW264.7細胞でMPCプレートの方が強く、A549細胞では24時間目、RAW264.7細胞では6時間目に、毒性の差が顕著に観察された。CHL, A549細胞において小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

3) HEMA/MEA シート

HEMA/MEAシート（PHEMAを除く4種類の混合比及び未コートシート）に対するCHL細胞増殖試験を行った結果、細胞増殖は、いずれの混合比、未処理シートにおいても、対照の6-wellプレートと差がなく、HEMA/MEAの混合比により細胞増殖に影響はないと考えられた。

平成 25、26 年度研究においては、血液適合性試験の各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、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、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。

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 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 をコートした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、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) 新規材料による血液適合性試験

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., Sakai K., Kato R., Matsuoka A.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers., Eurotox 2012 (Stockholm, 2012.6)
- 2) Kubo T., Hori T., Kuroda Y., Hojyo M., Miyajima A., Sunouchi M., Anne Corlu A., Morel F., Ozawa S., Sekino Y., Ishida S.: Comparative analyses of genomic DNA methylation and gene expression in hepatic cells. 第 27 回日本薬物動態学会年会 (東京、2012.11)
- 3) 宮島敦子、加藤玲子、酒井恵子、松岡厚子: 高分子医用材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性、2012 バイオマテリアル学会 (仙台、2012.11)
- 4) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)