

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題解決推進のための研究事業
(H25-地球規模-指定-008)

**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**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 新見伸吾

平成 27(2015)年 3 月

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

目 次

・ 総括研究報告書

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 (新見伸吾)	1
------------------------------------	---

・ 分担研究報告書

(1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設及び啓蒙活動に関する研究 (中岡竜介)	15
(2) 歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に 関する研究 (大熊一夫)	29
(3) 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 (藪島由二)	37

・ 研究成果の刊行に関する資料

(1) 一覧表	49
(2) バイオマテリアル-生体材料, 33(1):56-63 (2015)	51
(3) Dental Materials Journal, 33:422-429 (2014)	61
(4) J. Biomed. Mater. Res. Part B, 102B:721-728 (2014)	69
(5) J. Biomed. Mater. Res. Part B, 102B:1809-1816 (2014)	77
(6) 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	85
(7) J. Vinyl Add. Technol., in press	107

研究班名簿

研究代表者：新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者：齋島由二 国立医薬品食品衛生研究所
中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所
大熊一夫 日本歯科大学

研究協力者：野村祐介 国立医薬品食品衛生研究所
福井千恵 国立医薬品食品衛生研究所
中村義一 株式会社リボミック
宮川 伸 株式会社リボミック
金 玲 株式会社リボミック
袖場俊康 川澄化学工業株式会社
坂口圭介 テルモ株式会社
谷川隆洋 テルモ株式会社
杉山知子 テルモ株式会社
竹ノ内美香 テルモ株式会社
新藤智子 食品薬品安全センター
蛭原善則 株式会社ジーシー
Somchai Urapepon マヒドン大学

総括研究報告書

平成 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)

研究代表者	新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
研究分担者	薮島 由二	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
	大熊 一夫	日本歯科大学新潟生命歯学部歯科理工学講座

研究協力者

野村祐介	国立医薬品食品衛生研究所	谷川隆洋	テルモ株式会社
福井千恵	国立医薬品食品衛生研究所	犬飼香織	テルモ株式会社
中村義一	株式会社リボミック	竹ノ内美香	テルモ株式会社
宮川 伸	株式会社リボミック	新藤智子	食品薬品安全センター
金 玲	株式会社リボミック	蛭原善則	株式会社ジーシー
柚場俊康	川澄化学工業株式会社	Somchai Urapepon	マヒドン大学 (タイ)
坂口圭介	テルモ株式会社		

研究要旨

本研究では、「国際標準化機構 (ISO) 及び国際電気標準会議 (IEC) における医療機器の各種国際規格の策定に関する研究 (H23-地球規模-指定-003)」において策定した「医療機器規格・基準の国際標準化戦略に係る政策的提言」を具体的に実行する体制の構築に資する施策として、幾つかの ISO/TC の活動をサポートする窓口を試験的に開設し、その実用可能性を検証すると共に、国際標準に関する世界情勢を周知する啓蒙活動を行った。また、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、材料開発分野、試験法分野及び歯科分野においてケーススタディを実施した。

国際標準化戦略窓口の試験的設立については、昨年度に引き続き「再生医療等製品」及び「医療機器ソフトウェア」の国際標準化活動を行っている ISO/IEC の TC 国内委員会等に参加して情報収集を行い、それらの活動状況を取りまとめた。収集した情報は、医療機器部サーバー内にホームページを開設して可能な限り一般に発信した。また、啓蒙活動の一環として、医療機器の国際標準化に関する講演を 4 回行った。

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国際ラウンドロビンテストを支援するため、2 種類の弱陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シート (Y-2, Y-3) を本試験用標準品として提供した。Y-2 及び Y-3 は本試験においても良好な溶血特性を示し、その性能が世界的に確認されたことから、今後、ISO/TC194/WG12 に国際標準品として新規提案する。

材料開発分野におけるケーススタディでは、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を行った。その結果、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。

歯科分野におけるケーススタディでは、歯科用 CAD/CAM に関する規格を ISO/TC106/SC9 に日本から新規提案し、CD 化に至るまでの情報を収集した。平成 26 年 9 月に開催された ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議では、Convener として、5 カ国によるインターラボラトリーテストの結果報告及び各国から提出されたコメントに対応した。また、本 CD に新たな CMM 及びソフトウェアを追加することが提案され、2nd CD ヘステージアップした。

A．研究目的

近年、国際市場の拡大に伴い、医療機器に関する各国の法規制を整合化する動きが活発化している。IMDRF ではグローバルな整合作業が進められており、その他、ISO や IEC では医療機器の性能や試験法等、有効性と安全性に関する各種規格・基準の国際整合化が行われている。医療機器については、品質維持の観点から国内法規への適合が求められると共に、主に通商上の観点から国際規格への適合も要求される。すなわち、我が国の優れた製品を世界的に流通させるためには、日本の国内法規における要求事項を反映した国際規格を作成し、運用することが最適と言える。また、日本は医療機器開発において先進的な技術力を持つことから、国際的な優位性を確立することが可能な状況にある。例えば、製品や材料の性能評価等に関する技術については、差別化による高付加価値化を狙い、新たな市場を開拓していくことが重要である。このため、研究開発段階から標準化を視野に入れたプロジェクトを推進すると共に、国際標準策定に必要なデータ取得、ラウンドロビンテスト等を産業界と一体となり推進することが必要である。

医療機器産業は急成長しており、世界的競争が激化しているが、国内で使用されている医療機器は輸入が年々拡大している。2010 年では 0.6 兆円の貿易赤字となっているのが現状であり、日本のモノづくりの力が生かされていない。米国・FDA/ANSI、ドイツ・DIN、フランス・AFNOR、英国・BSI 等、主要国には国内・国際規格に関与する国家機関が存在し、基礎データの収集や保持も行っている。日本には JISC/JSA があるが、諸外国の関連機関と

比較して実質的に対等の機能を果たしていないと思われる。また、デファクト標準に頼っていた我が国の医療機器関連企業はデジュール標準の時代が到来していることを認識する必要がある等、我が国における国際標準化に係る環境や意識は他国と比較して立ち後れているのが現状である（図 1）。

このような背景の中、現在までに国内の医療機器の評価手法、必要な基準の策定、国際的な整合等に関する研究や活動は行われて来ているが、日本発の良質な医療機器を障壁なく国際的に進出させる環境を整備する戦略的な研究は実施されていなかったため、平成 23,24 年度厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進）研究事業「国際標準化機構（ISO）及び国際電気標準会議（IEC）における医療機器の各種国際規格の策定に関する研究（H23-地球規模-指定-003）」において、国際的に提案できる基準の選別や原案策定過程への提案を含めて、国際標準化活動を国家的にサポートする体制の構築や戦略的な考え方等を取りまとめた「医療機器規格・基準の国際標準化戦略に係る政策的提言」を策定した。

本研究では、この政策的提言を具体的に実行する体制の構築に資する施策として、幾つかの ISO/TC の活動をサポートする窓口を試験的に開設し、その実用可能性を検証すると共に、国際標準に関する世界情勢を周知する啓蒙活動を行った。また、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、材料開発分野、試験法分野及び歯科分野においてケーススタディを立ち上げ、検証データ等を収集した（図 1）。

本研究においては、以下に示した 3 件の分担研究課題を実施した。各課題の方法、結果及び考察の詳細については、該当する分担研究報告書を参照していただきたい。

<サポート窓口の開設と啓蒙活動>

ISO/TC 共通窓口の試験的開設及び啓蒙活動に関する研究（中岡、配島）

<歯科分野ケーススタディ>

歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究（大熊）

<試験法・材料開発分野ケーススタディ>

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（配島）

B. 研究方法

(1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設及び啓蒙活動に関する研究

1-1. ISO/TC 共通窓口の試験的開設

再生医療等製品及び医療機器ソフトウェアを取り扱う TC の国内委員会に委員又はオブザーバー等の立場で参加し、情報収集を行った。

1-2. 国際標準化に対する啓蒙活動

啓蒙活動の一環として、本事業の紹介と医療機器分野における国際標準化の重要性に関する講演や医療機器関連の学会誌へ総説・解説等の寄稿を行った。

(2) 歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究

2-1. インターラボラトリーテスト

新規規格に記載した寸法の 1 級インレー用、2 級インレー用、クラウン用及びブ

リッジ用金型から三次元データを取得し、切削用三次元データに変換し、半焼結ジルコニアセラミックブロックから CAD/CAM マシンを用いて修復物を作製した。作製した修復物を金型に装着し、金型と修復物の変位量を測定し、修復物の精度の評価を行った。

2-2. 測定のための印記

最初の測定点を 0° とし、修復物と金型との変位量を測定した。同様に、 45° 、 90° 、 135° 、 180° 、 225° 、 270° 、 315° 毎に試料を回転させ、計 8 点における修復物と金型との変位量を測定した。

2-3. CAD/CAM 材料の被切削面

ジルコニア未焼結の加工は Dry 条件下、加工ピッチ 0.1mm、仕上げ代 0.1mm、ジルコニア用ダイヤコート、送り速度 500mm/min、工具回転数 2500min^{-1} で行い、ジルコニア本焼結、コンポジットレジン及びチタンにおいても同一の加工条件で切削した。加工状態は被切削面を観察することにより評価した。

2-4. ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議

WG5 (Machined devices) に Convener として出席し、日本からの新規提案規格である「Machining accuracy of computer-aided milling machine - Test methods」について討議した。

(3) 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

3-1. ISO/TC194/WG9 溶血性試験ラウンドロビンテスト支援

3-1-1. 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、ESB0 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。

3-1-2. 溶血性試験ラウンドロビンテスト

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。

3-1-3. 倫理面への配慮

動物及びヒト血液を使用する研究は、実施機関が所管する動物実験倫理委員会及び研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

3-2. RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製

3-2-1. bFGF を捕捉する RNA アプタマー材料開発

昨年度開発した方法に従い、bFGF 捕捉型 RNA アプタマー (1p01) 及び陰性対照である poly dT (pdT) を金コートガラス版上に固定化した。培地としては DMEM 及び MSCGM を使用し、血清は 5% ヒト血清 (HS)

及びウシ胎児血清 (FBS) を用いた。各培地で 30 分間プレインキュベーションした後、マウス線維芽細胞又はヒト間葉系幹細胞を播種し、5% CO₂ 雰囲気下 37 で培養した。hMSC は培養開始から 2 日後、NIH3T3 は培養開始 3 日後に固定化し、Hoechst 33258 染色後、核数を計測することにより、細胞増殖能を評価した。

3-2-2. BMP2 を捕捉する RNA アプタマー材料開発

BMP2 結合能を有する RNA アプタマー候補の選定は、BMP2 をアミノカップリングさせた NHS 樹脂を用いる SELEX 法により行なった。一連のサイクルを合計 10 ラウンド繰り返し、最終ラウンドの PCR 産物を TOP0 ベクターにクローニングし、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することで、RNA アプタマー候補を取得するための評価を行った。得られた候補配列について、プログラム Mfold 及び RNAfold を用いて二次構造解析を行ない、BMP2 結合に重要な構造モチーフを検索した。

SELEX 法によって得られた RNA アプタマー候補と BMP2 の結合能は電気泳動移動度シフトアッセイ法 (EMSA) 及び表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて評価した。

C. 研究結果

(1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設及び啓蒙活動に関する研究

1-1. 再生医療等製品

ISO における「再生医療等製品」の標準化における全体的な状況に大きな変化は見られなかったものの、International Alliance for Biological Standardization (IABS) が細胞治療に関する標準

化の議論を行っていることが判明した。
また、個別の ISO/TC においては、昨年度よりも活発な動向が認められた。

1-2. 医療機器ソフトウェア

医療機器ソフトウェアのセキュリティに関する参照規格は、IEC SC 62A と ISO/TC 215 との JWG 7 に集約された。医療機器の品質管理 (QMS) に関する国際規格 (ISO 13485) の改訂作業が ISO/TC 210 で進んでいる。この規格には参照文書としてソフトウェアの製品及びプロセス規格が明記されると共に、非常に多くのソフトウェア関連規格が QMS に取り込まれることになっている。現在、二度目の DIS 投票を目指して再改訂中であり、2015 年半ばには再度 DIS 投票が行われる予定である。また、Software for Medical Device における設計・開発 (ライフサイクル) プロセスのための規格であった IEC 62304 を Health software 全般を対象にした改訂版 (第 2 版) の作成が開始されたことも明らかとなった。なお、今回取りまとめた調査結果は、昨年度同様、医療機器部サーバーに開設した本研究紹介用ホームページにより適宜更新の上、公開している (<http://dmd.nihs.go.jp/chikyukibo/index.html>)。

1-3. 国際標準化に対する啓蒙活動

法人や学会等で医療機器業界関係者や国際標準化に取り組んでいる関係者を対象にした発表・講演を行い、医療機器における国際標準化の現状報告とその重要性の啓蒙を行った。

(2) 歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究

2-1. インターラボラトリーテスト

タイのクラウンと金型の変位量の測定結果は、ジルコニアセラミックスで平均 +0.08mm、コンポジットレジンで +0.50mm、ワックスで +0.08mm であった。日本のジルコニアセラミックスで作製した精度は +0.005mm であった。この差は変位量の測定機器の限界によるものである。加工精度は、被切削材料に影響をされるが、日本から提案した方法により評価できることが確認された。

2-2. 測定のための印記

1 級インレーと金型との変位量の平均は +0.962mm であり、クラウンの場合は +0.422mm となった。1 級インレーとクラウンの標準偏差は、それぞれ 0.074 及び 0.024 であり、変位量平均値の 1/10 程度の小さい値であった。また、測定回数が多くなるほど、修復物と金型の変位量が減少する傾向が認められた。これらの成績から、測定のための印記は必要性ないことが確認された。

2-3. CAD/CAM 材料の被切削面

ジルコニア本焼結の被切削面の中心部に十字用の大きな工具による痕が残ると共に、切削加工中に工具が破損する等、適正な加工条件でないことが判明した。一方、ジルコニア未焼結は切削工具の痕が認められず、適正な被切削面であることが確認された。同様に、コンポジットレジンも適正な被切削面、純チタンは不適正な被切削面であることが確認され、被切削面から適切な切削加工条件を評価できることが判明した。

2-4. ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議

平成 26 年 6-8 月にかけて実施された投票の結果、賛成 9 カ国、反対 3 カ国（オーストラリア、ブラジル及びスウェーデン）、棄権 2 カ国をもって、日本が提案した CD は採択された。概ね日本の提案については合意が得られたが、日本提案の金型を用いた測定方法でなく、CMM (Coordinate Measuring Machine: 三次元測定機) 及び三次元の元データと CAD/CAM で作製したセラミック修復物の三次元データの変位量の差を求めるソフトウェアが米国から提案された。この結果、これらの項目を追加した 2nd CD にステージアップすることになった。

(3) 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

3-1. ISO/TC194/WG9 溶血性試験ラウンドロビンを支援

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/抽出液法とともに、ほぼ 100%の溶血率を示した。一方、NG の溶血特性を 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。

主に直接接触法において弱陽性反応を示す LG 及び BR の溶血特性は、抽出液法による試験では検出できなかった。一方、我々が提供した弱陽性対象材料である Y-2 及び Y-3 は直接接触法のほか、抽出液法においても理論的な溶血特性を示すことが確認された。

3-2. RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製

3-2-1. bFGF 捕捉型 RNA アプタマー材料開発

bFGF 捕捉型 RNA アプタマー-1p01 及び陰性対照である pdT をコートした材料上で細胞培養を行なった結果、5% HS 条件下では培地の種類を問わず、NIH3T3 及び hMSC とともに、1p01 コート材料上で培養した方が高い増殖能を示すことが確認された。また、5% FBS/DMEM 培地条件下で hMSC を培養した場合にも、1p01 コート材料は増殖促進作用を示したが、5% FBS/ MSCGM 培地条件下の場合、1p01 及び pdT コート材料は同等の増殖能を示した。

3-2-2. BMP2 捕捉型 RNA アプタマー材料開発

BMP2 と結合する RNA アプタマー候補は 5 種類 (B10, B20, B24, B32, B37) の配列に収束されていることが明らかとなった。B10, B20, B24, B32 及び B37 の出現頻度は、それぞれ 6.9%, 16.9%, 8.5%, 45.1%及び 12.7%であり、B32 が最も多く観測されていた。

5 種類の RNA アプタマー候補と BMP2 の結合能を EMSA により評価した結果、二価イオン非存在下では、BMP2 を添加することにより、スミ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 については、明瞭な複合体バンドが観測された。BIAcoreを用いた SPR 法による解析の結果、RNA アプタマー候補に BMP2 を添加することにより、例外なく RU 値の上昇が確認されたことから、5 種類の RNA アプタマー候補は、いずれも BMP2 に結合することが判明した。

D. 考 察

(1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設及び啓蒙活動に関する研究

1-1. ISO/TC 共通窓口の試験的開設

再生医療等製品の開発から上市に至る過去の経緯から判断すると、実用化を加速するための環境整備が必要であると共に、再生医療等製品の特性を理解し、その種類（細胞/Scaffold/増殖因子複合製品、細胞シート製品、細胞治療等）を明確にしておく必要があると思われる。

我が国の再生医療等製品で製造販売承認を得たものは2品目のみであり、その他は未だに治験や臨床研究の段階であることから、再生医療等製品の国際標準化にまで目が行き届かない面がある。しかしながら、実用化までの時間はまだ必要なものの、我が国発の万能細胞である iPS 細胞を利用した製品開発が進んでいることから、知的財産権との効率的な併用を考慮しつつ将来展開を見越した「デジュール」規格の作成を戦略的に進めていかなければならないと考える。作成された国際規格が実際に規制当局に利用されるか否かは別に議論しなければならないが、少なくとも我が国がこの分野で主導権を握っていくためには stakeholder 間で情報及び認識を共有しつつ、戦略的且つ統一的に再生医療等製品の国際標準化に取り組んでいかなければならないことが明確となった。

現在、我々は、再生医療等製品と関連した標準化作業を行っている TC 150/SC 7、TC 194/SC 1、TC 198、TC 276 国内委員会関係者及び関係省庁関係者との間で、再生医療等製品に関する国際標準化に関して統一した方向性と連動性を共有するた

めの連携体制構築に、非公式ながら取り組み始めている。この活動が、今後の再生医療等製品関連の国際標準作成を戦略的な All JAPAN 体制で行うための土台となることを、我々は期待している。

医療機器ソフトウェアの標準化については、米国が主導権を握ってその作成を行っていることが示唆される調査結果を得た。しかしながら、医療機器としての標準化にも拘わらず、ISO 側では主に情報系専門家で形成される TC 215 が関わっており、医療機器の特性を考慮しない規格が作成されるのではないかとこの点が危惧された。

国内では、医薬品医療機器法が施行されたことに伴い、QMS 省令も修正され現行の ISO 13485 との整合性が高められたばかりである。上記改正が成立した場合、近い将来、QMS の国際整合の再考慮が課題となる可能性があるため、医療機器ソフトウェアのみならず、医療機器分野全体の課題として ISO 13485 の改訂内容を注視していかなければならないと考える。また、現在改訂中の IEC 62304 を中心とした医療機器ソフトウェア関連国際規格が規制においても重要になることは明らかであり、我が国も産官学共同でこれらの規格作成に積極的に関与しなければならない状況になっていることが示唆されている。

1-2. 国際標準化に対する啓蒙活動

平成 26 年度に行った講演は、それぞれ研究センター、学会、標準化関連団体、ISO 活動支援団体が主催したものである。国際標準化に関する興味の度合いは異なるが、講演後に多数の質疑を受けたことから、その重要性を相応に啓蒙すること

ができたと思われる。本年度は企業を対象とした講演を実施できなかったことから、今後、企業上層部に直接国際標準化の必要性を周知する活動を実施する予定である。

(2) 歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究

インターラボラトリーテストにおいて使用した 2 級インレーの治具では、咬合面と側方の両方から 50N の荷重を同時に加えることができるようになり、測定精度が格段に向上した。今回行った実験において、試料を 45° 毎に回転させて計 8 点の各金型との変位量を測定する場合、一定の小さい定点に定荷重を加えることが可能であり、精度の高い測定結果を得ることができた。また、測定精度の向上及び測定時間の短縮を図ることを目的として作製したレーザ計測を応用した測定機は修復物と金型の変位量を随時測定することが可能であり、精度の高い測定結果を得ることができた。

ベルリン会議を通じて、国際標準化作業を円滑に進めるためには、国際会議における丁寧な説明、会議資料の提供や各国エキスパートに対するロビー活動が非常に重要であることを再確認した。

(3) 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

3-1. ISO/TC194/WG9 溶血性試験ラウンドロビンテスト支援

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。

3-2. 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 及び陰性対照である pdT を材料表面上に固定化し、両材料上で細胞培養を行なった結果、5% FBS/MSCGM 培養条件下の場合、hMSC の増殖能は pdT 及び 1p01 間に顕著な相違は観察されなかった。この現象は、hMSC 増殖用に最適化された MSCGM 培地に含まれる増殖因子が同細胞に優先的に作用し、RNA アプタマーによる効果が減弱したことに由来すると思われる。一方、その他の培養条件下においては、陰性対照である pdT と比較して、1p01 コート材料表面上で細胞数が多く観測されていることから、同材料は細胞増殖促進効果を有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行うと共に、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実施することにより、医用材料としての有用性を検証する。

BMP2 に対する RNA アプタマーを用いた

新規骨充填剤の開発を目指し、SELEX 法により BMP2 に結合する RNA アプタマー候補の選定を行なった結果、得られた RNA アプタマー候補は 5 種類の配列に収束していたが、共通の構造モチーフが認められなかったことから、各候補はそれぞれ特有の構造を有していることが示唆された。

RNA アプタマー候補と BMP2 の相互作用を EMSA によって解析した結果、 Mg^{2+} イオンの有無により、その挙動が異なっていた。B10 及び B24 は Mg^{2+} イオン存在下において、明瞭な複合体バンドとして検出された。これは、 Mg^{2+} イオンが両 RNA アプタマー候補と BMP2 の結合に密接に関与することを示唆している。一方、SPR 法による相互作用解析において、SELEX 法と同様に二価又は一価の金属イオンを添加した条件下で評価した結果、5 種類の RNA アプタマー候補は BMP2 に対して、40N ランダム配列よりも強い結合能を有することが確認された。本研究において使用した SELEX の条件下では、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 及び Na^{+} イオンが共存しているため、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有する可能性も示唆された。

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保存された構造モチーフが確認されないと共に、相互作用解析における挙動が異なることから、それぞれが異なる機構で BMP2 と結合していることが示唆された。RNA アプタマーを利用した医用材料の開発に応用するためには、BMP2 の生理活性を阻害しない配列が必要であるため、今後、5 種類全ての RNA アプタマー候補を用いて、BMP2 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 アプタマー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。

E . 結 論

(1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設及び啓蒙活動に関する研究

1-1. ISO/TC 共通窓口の試験的開設

昨年度同様、「再生医療等製品」と「医療機器ソフトウェア」にテーマを絞り込み、現在行われている国際標準化活動状況を取りまとめた。その結果、前者では製品開発に先行して「デジュール」規格の作成が始まっており、複数の ISO/TC で関連技術の国際標準化作成作業が活発化していること、後者においてはその標準化が QMS をも巻き込み複雑化しているが、その鍵となる ISO 13485 の改訂が滞っていることが明らかとなった。前者においては、我が国が主導権を握れる分野であり、製品の実用化に先立った「デジュール」規格作成が活発化していることから、製品カテゴリーの明確化や All JAPAN 体制を構築して戦略的な活動を実施しなければならないことが明らかになった。後者においては、ソフトウェアを内包する医療機器も含め、その規制が厳しくなる可能性があることも示唆されたが、鍵となる ISO 13485 の改訂が遅れていること、それに伴いその内容に変更が生じる可能性が示唆された。ISO 13485 の改訂は、我が国における QMS 省令へも影響を及ぼす可能性があること、ソフトウェア関連国際標準をどのように規制に取り入れていくかを検討している段階であることから、今後、我が国も積極的にその作成に関与していかなければならないことが示唆された。

1-2. 国際標準化に対する医療機器関連企業の意識調査

医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙する目的で、計4回、医療機器関連団体等を対象に研究発表、講演を行った。その結果、ある程度医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙することができた。

(2) 歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究

インターラポラトリーテストの結果、CAD/CAM により作成されたセラミック修復物の加工精度は、日本が提案した CD「Machining accuracy of computer-aided milling machine - Test methods」により正しく評価できることが確認された。また、ベルリン会議（平成26年9月）における討議の結果、本提案規格に CMM とソフトウェアを追加して 2nd CD ステージに進めることとした。

国際会議では、会議前の丁寧な説明及び会議資料の提供により、各国からの信頼を得ることが重要である。また、日本から提案した医療技術を国際標準化する一つの道は、WG の Convener を獲得することである。

(3) 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

3-1. 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。

3-2. 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。

F . 健康危険情報
特になし。

G . 研究発表等
<誌上発表>

- 1) 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) .
- 2) Koide M, Ohkuma K, Ogura H, Miyagawa Y. A new method for fabricating zirconia copings using a Nd:YVO4. Dental Materials Journal, 33:422-429 (2014).
- 3) 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 poly-

vinyl chloride sheets for blood containers. J. Vinyl Add. Technol., in press (2015).

- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).

<学会発表>

- 1) 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)
- 2) 中岡竜介. 医療機器に関連した国際標準化状況について: ISO/TC 150 (外科用インプラント)を中心に. 「ISO/TC 150 (外科用インプラント)とバイオセラミックスの国際標準化の状況」講演会 (2015年1月・東京)
- 3) 中岡竜介. 国際幹事経験談及び医療機器分野国際標準化の現状について. 平成26年度第2回ISO国際標準化研修上級編(実践コース)(2015年1月・東京)
- 4) 小出未来, 大熊一夫, 小倉英夫, 宮川行男 Nd:YVO4 レーザを用いたジルコニアコーピングの新しい加工法 被照射面の熱処理後のラマン分光分析. 日本歯科理工学会第63回春季学術講演会 (2014年4月・千葉).
- 5) 赫多 清, 大熊一夫, 宮川行男. 陶材の咬合摩耗に及ぼす試験片支持材料の影響. 日本歯科理工学会第64回周期学術講演会 (2014年10月・広島).
- 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, 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).
- 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, 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).
- 8) 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）．

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）．

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

国際標準化に関する世界情勢（現状）

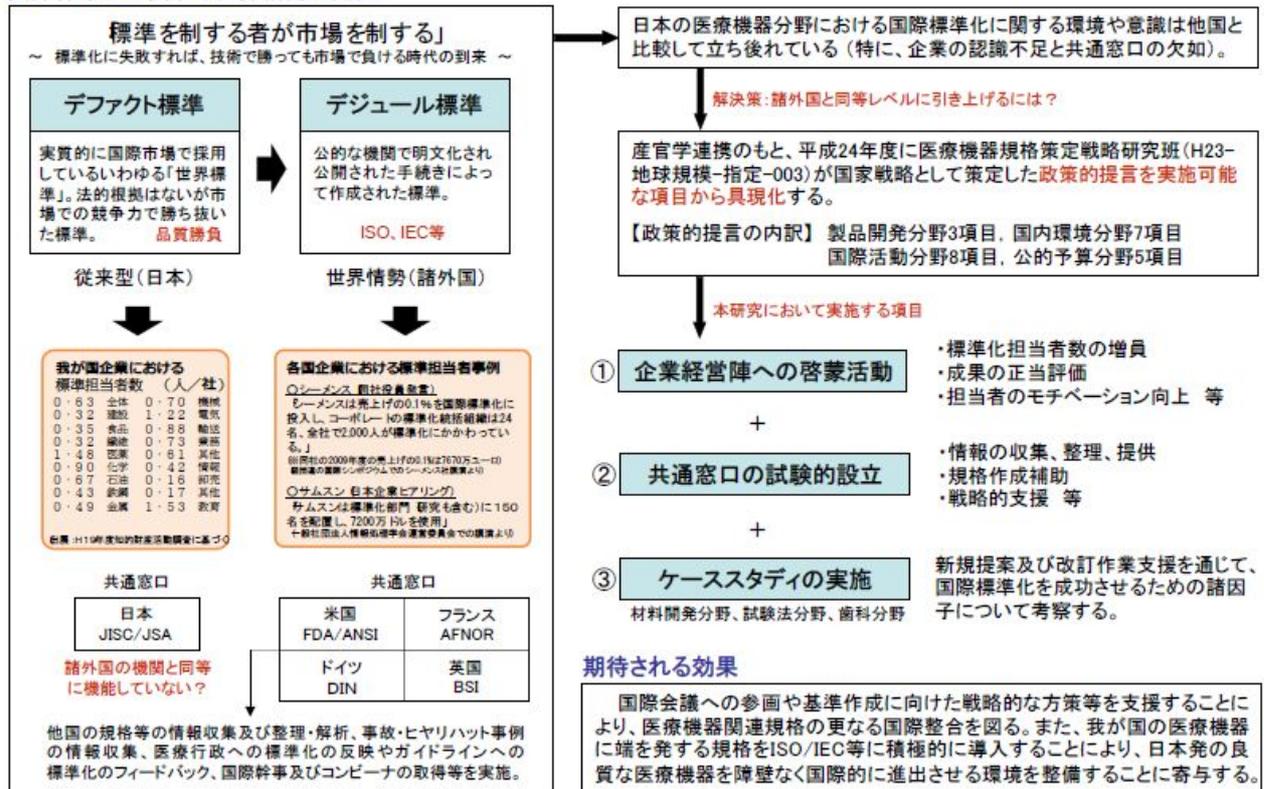


図 1. 本研究の概要

分担研究報告書

平成 26 年度厚生科学研究費補助金（地球規模保健課題推進）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

ISO/TC 共通窓口の試験的開設及び啓蒙活動に関する研究

研究分担者	中岡 竜介	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
研究協力者	齋島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

研究要旨

平成 23,24 年度に行った厚生労働科学研究費補助金 / 地球規模保健課題推進事業において作成した「医療機器規格・基準の国際標準化戦略に係る政策的提言」を具体的に実行する体制の構築に資する施策として、ISO/TC の活動をサポートする窓口を試験的に開設した。今年度も、昨年度に引き続き「再生医療等製品」及び「医療機器ソフトウェア」の国際標準化活動を行っている ISO/IEC の TC 国内委員会等に参加して情報収集を行い、それらの活動現状を取りまとめた。取りまとめた情報は、医療機器部サーバー内にホームページを開設して可能な限り情報を一般に発信した。また、啓蒙活動の一環として、医療機器の国際標準化に関する講演を 4 回行った。

A. 研究目的

近年の国際市場拡大により、法的規制を国際的に整合化する動きが活発になっている。同時に、医療機器の性能や試験法等、有効性と安全性に関する各種規格・基準の国際整合化が ISO や IEC で行われている。これらの規格・基準は各国における法的規制にも使用されている。これらの状況を鑑みると、今後、医療機器の許認可においては、その国内法規への適合のみならず各種国際規格への適合も要求されることになる。

平成 26 年に閣議決定された「健康・医療戦略」では健康・医療に関する国際展開の促進が施策として挙げられ、医療分野、特に医薬品、医療機器等の審査において利用可能な国際標準化の策定、提案等の推進が明記された。

医療機器に関しては、多くの JIS (Japan industrial standards) 規格が存在し、それらは許認可における技術基準・規格として数多く利用されている。近年、JIS 規格は国際標準化機構 (ISO) / 国際電気標準会議 (IEC) 等の関連国際規格を医療機器業界が翻訳して作成していることが非常に多いため、元の国際規格を日本が先導して作成することが、国際市場において日本の医療機器業界が優位に立つ上で重要になってきていることになる。これまでも、医療機器の認証基準や各種ガイドライン等に引用規格として適宜 ISO や IEC は用いられてきたところであるが、今後は単なる引用に留まらず、我が国の技術を医療機器関連の国際規格とし、日本発医療機器を国際的に展開するための戦略とそのための環境構築が推進される

ことになる。

さらに、昨年 11 月 25 日より、薬事法が改正され医薬品医療機器等法が施行されたことに伴い、国内において医療機器の特性を踏まえた規制が構築されることになった。この改正により、第三者認証制度が一部の高度医療管理機器にも拡大される等、医療機器規制が変化するため、許認可における医療機器関連規格やその国際標準化の重要性はますます高まる一方である。

このような状況にも関わらず、国内の医療機器の評価手法、必要な基準の策定、国際的な整合等に関する研究や活動は行われて来ているものの、日本発の良質な医療機器を障壁なく国際的に進出させる環境を整備する戦略的な研究は実施されていなかった。

そこで、産官学連携のもとに平成 23,24 年度厚生労働科学研究費補助金 / 地球規模保健課題推進事業「国際標準化機構 (ISO) 及び国際電気標準会議 (IEC) における医療機器の各種国際規格の策定に関する研究 (H23-地球規模-指定-003)」において「医療機器規格・基準の国際標準化戦略に係る政策的提言」が作成された。その具体的な提言内容の一つが、自国政府及び関連省庁と連携して基礎データの収集や保持管理も行いつつ国際標準化活動を分野毎に取りまとめ、一元的且つ戦略的に実施・サポートする機関を国内に設立することであった。我が国においては、ISO への正式な参加機関として日本工業標準調査会 (Japanese Industrial Standards Committee: JISC) が登録されているが、あくまでも ISO や各技術委員会 (Technical Committee: TC) における重要事項の決定・投票機関として機能す

るに留まっており、標準化の実務は各 TC を担当する国内審議団体に委ねられている。医療機器分野に関連する複数の TC における実務は各々の国内審議団体により取り仕切られており、その対象分野に特化した業界団体が活動を独立して実施・支援している。そのため、それらの活動状況や審議内容を包括的且つ具体的に把握している組織・団体等は存在しないのが現状である。

そこで、本研究においては、医療機器関連の国際標準化状況の包括的な把握を試行するために、特定の分野を選択してその国際標準化状況に関する情報収集と発信を行うと同時に、我が国における国際標準化活動の課題やその有効活用を行うための対策を考察した。本研究では、現在のニーズや社会的背景等を考慮して「再生医療等製品分野」と「医療機器ソフトウェア分野」を最初の対象分野とし、昨年度からそれらに関連する ISO/IEC の関連 TC 国内委員会に参加して各々の TC における活動状況及び国際標準化対象を調査してきた。今年度は、昨年度からの両分野における進捗状況を取りまとめ、上述した課題や対策、さらには今後、日本発の国際標準を作成するための戦略を考察した。

一方、国際標準化を戦略的に進めて行くためには、医療機器業界の積極的関与も必須であることが前述した提言にも挙げられていた。そのためには、企業として国際標準化活動に参画し、エキスパートの貢献が正当に評価される環境を整えるため、会社経営者層を対象として国際標準に関する世界情勢とその重要性を周知する啓蒙活動を行う必要がある。昨年度のアンケート調査結果から、医療機器

分野の国際標準化活性化のためには、国を挙げてのサポートだけではなく、企業上層部の意識改革を目的とした啓蒙活動を行う必要が示唆されたことから、本事業の紹介を兼ねた医療機器国際標準化の重要性に関する啓蒙のための講演や寄稿を行った。

B. 研究方法

1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設

昨年度に引き続き、試験的窓口業務の対象として、医薬品医療機器等法の施行により医薬品、医療機器と並んで個別分野となる「再生医療等製品」と、Stand alone 製品であっても医療機器として扱われることになる「医療機器ソフトウェア」を選択した。

まず、それぞれの分野における国際標準化活動を行っている ISO/IEC の TC を調べ出し、当該 TC の国内審議団体を介してそれぞれの国内委員会に委員、オブザーバー等で参加し、情報収集を行った。以下に参加した TC を記す。

<再生医療等製品>

- ・ ISO/TC 150/SC 7 「再生医療機器」(国際幹事)
- ・ ISO/TC 194 「医療機器の生物学的及び臨床評価」(国内委員)
- ・ ISO/TC 194/SC 1 「組織由来製品の安全性」(国内委員)
- ・ ISO/TC 198/WG 9 「無菌処理」(オブザーバー)
- ・ ISO/TC 276 「バイオテクノロジー」(ミーティング)

<医療機器ソフトウェア>

- ・ ISO/TC 210 「医療機器の品質管理と関

連する一般事項」(オブザーバー)

- ・ IEC/TC 62 「医用電気機器」(オブザーバー)
- ・ IEC/TC 62/SC 62A 「医用電気機器の共通事項」(オブザーバー)
- ・ IEC/TC 62/SC 62D 「医用電子機器」(オブザーバー)

なお、ISO 全体の活動を実質的に管理する Technical management board (TMB) に日本がメンバーとして参加していることから、TMB における審議を補助する目的で ISO 上層対応委員会が設立されている。今年度は、その委員会にもメンバーとして参加することで、ISO における最新の医療分野の標準化動向調査も行った。

収集した情報を元に、両分野における国際標準化の動向を取りまとめ、今後の展開に関する考察を行った。また、取りまとめた動向等に関する情報発信ホームページの立ち上げを開始した。

2) 国際標準化に対する啓蒙活動

「政策的提言」では、我が国が国際標準化において戦略的に活動しその主導権を握るために、まず、企業において国際標準化に関する現在の状況とその重要性を認識してもらうことが重要であることが示されている。そこで、今年度は啓蒙活動の一環として、本事業の紹介と医療機器分野における国際標準化の重要性に関する講演や医療機器関連の学会誌へ総説・解説等の寄稿を行った。

C. 研究結果

1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設

昨年度に引き続き、今年度も、「再生医療等製品」及び「医療機器ソフトウェア」

を対象に国際標準化活動状況に関する調査を行った。以下に、両分野におけるこの1年での進捗状況を示す。

[再生医療等製品]

ISOにおける「再生医療等製品」の標準化における全体的な状況に大きな変化は見られなかったものの、International Alliance for Biological Standardization (IABS) が細胞治療に関する標準化の議論を行っていることが判明した(図1)。また、個別のISO/TCにおいては、昨年度よりも活発な動向が認められた。

今年度、TC 150/SC 7においては、再生軟骨におけるグリコサミノグリカン(sGAG)の染色による定量評価方法の標準化提案が正式に採択され、標準化に向けた作業が始まった。一方、かねてから提案されていた骨組織再生評価方法は、評価に用いる細胞ソースがラットの初代間葉系幹細胞であったことから、動物愛護の観点からの反対票が多くなり、結果、不採択となり、その内容修正を余儀なくされている。一方、「用語」や「一般的要求事項」に関する標準化の取り組みに関しては、予備的作業がWeb会議ベースで進んでいる。なお、日本提案で作成が始まった「MRIを用いた軟骨再生評価方法」に関する文書が、2014年2月にTechnical Reportとして発行されている。

TC 198/WG 9では細胞を含む製品を対象とした「無菌操作」に関する国際標準化文書の作成が進んでおり、既にDIS(Draft International Standard)投票を2回終えている。2度目のDIS投票において、オーストラリアとドイツから、非常に多くのコメントが寄せられていることが確認

されたが、投票国全てが賛成票を投じていたおり、その標準化文書発行のための条件は満たされていたことから、2015年中に当該文書が発行される可能性があることが判明した。

TC 276では「医療産業は業務範囲から除外する」ことになっているものの、WG 4“Bioprocessing”で、日本の再生医療イノベーションフォーラム(FIRM)を中心に再生医療等製品の製造プロセスに関連した標準化を目指して作業を進めていることが明らかとなった。また、WG 1では、各国で定義されているバイオテクノロジー関連用語を収集・整理した「辞書」の作成に取りかかっているが、その用語対象の中に、再生医療等製品に関連するものが含まれていることが判明した。

TC 194及びTC 194/SC 1では、現在、再生医療等製品に関連した標準化作業は行われていないものの、4月に三島市で開催された総会でのWG 15会議では再生医療等製品の標準化状況に関する情報共有が為された。また、SC 1で発行された、ISOにおける唯一の再生医療等製品関連標準であるISO 13022“Medical products containing viable human cells – Application of risk management and requirements for processing practices”の定期見直しは2015年に行われる予定であったが、ISOのルール改訂が行われたため、その実施は不透明な状況であることも判明した。なお、SC 1は、現在、活動再開を検討しており、2015年中にTC 150/SC 7との共同会議開催を行うべく調整を行っていることが明らかとなっている。

[医療機器ソフトウェア]

医療機器ソフトウェアを取り巻く国際標準化の全体的な状況にも若干の変化が見られた。具体的には、医療機器ソフトウェアのセキュリティに関する参照規格が、IEC SC 62A と ISO/TC 215 との JWG 7 とで作成している規格類のみとなったことである（図 2）。このことは、ISO において「セキュリティ」全般を扱う TC が新たに設立されることと関係している可能性があるが、詳細は調査中である。なお、図 2 は、引き続き IEC/TC 62 Software and Networks Advisory Group (SNAG) 国内支援委員会資料を改変したものである。

「医療機器ソフトウェア」に関しては、医療機器とソフトウェアとの異なる視点を統合して標準化を行わなければならないため、非常に複雑な状況となっていることが、昨年段階で明らかとなっている。その中で、最も重要且つ影響度の大きい「医療機器の品質管理 (QMS)」に関する国際規格 (ISO 13485) の改訂作業が ISO/TC 210 で進んでいるが、昨年前半に実施された DIS 投票において次のステージである Final DIS (FDIS) 文書とすることが否決された。この規格では参照文書としてソフトウェアの製品及びプロセス規格が明記されることになり、医療機器ソフトウェアが QMS の対象となりうること、それ以外に、図 1 に示したように、非常に多くのソフトウェア関連規格が QMS に取り込まれることになっている。現在、二度目の DIS 投票を目指して再改訂中であり、2015 年半ばには再度 DIS 投票が行われる予定である。

また、QMS に引用される各種規格は IEC 単独ではなく、ソフトウェア関連の IEC/TC と ISO/TC との合同ワーキンググループ (joint WG) で作成されていること、

医療機器関連の規格となるにも関わらず ISO 側からは医療情報を中心に扱っており、情報系の専門家が多数参加している TC 215 が関わっているケースが多いことが昨年の調査で明らかになったが、今年度の調査により、TC 215 が参加する JWG 7 において、本来、Software for Medical Device における設計・開発 (ライフサイクル) プロセスのための規格であった IEC 62304 を Health software 全般を対象にした改訂版 (第 2 版) 作成が開始されたことも明らかとなった。

ISO における医療関係の標準化状況であるが、先述した TC 276 以外に近年設立された TC は、6 年前に設立された漢方薬を取り扱う TC 249 のみであり、現時点で新たな TC が設立される動きはないことが明らかとなった。既存の TC においては、医療情報を扱い、IEC と共同でソフトウェア関連標準を作成している TC 215 「医療情報」の活動手順に関して問題点があること、TC 121 「麻酔装置及び人工呼吸器関連装置」で欧州規格との調整が上手くいかず標準化が遅れていること等が TMB で問題視されていることも判明したが、標準化の内容自体は問題になっていなかった。

なお、今回取りまとめた調査結果は、昨年度同様、医療機器部サーバーに開設した本研究紹介用ホームページにより適宜更新の上、公開している (<http://dmd.nihs.go.jp/chikyukibo/index.html>)。今年度は、特に医療機器ソフトウェア分野の情報を中心に情報公開を進めた一方、再生医療等製品に関する情報も最新情報への更新を適宜行った。

2) 国際標準化に対する啓蒙活動

昨年度、医療機器企業における国際標準化に関する理解や活動状況・姿勢を確認するために、医療機器業界団体に傘下企業への配布を依頼して実施したアンケート結果から、企業のみならず、業界全般に対する啓蒙活動の必要性が明らかになった。このことを受けて、法人や学会等で医療機器業界関係者や国際標準化に取り組んでいる関係者を対象にした発表・講演を行い、医療機器における国際標準化の現状報告とその重要性の啓蒙を行った。以下に、今年度実施した講演を記す。

- ・（公財）先端医療振興財団臨床研究情報センターにて「再生医療分野の標準化状況、一般的な ISO 作成手順と取得対象及び方法」のタイトルで講演（2014.5.9）
- ・第 53 回日本生体医工学会大会、オーガナイズドセッション「医療機器における橋渡し研究と国際標準化の推進」にて「橋渡し研究及び国際標準化の行政的支援」のタイトルで講演（2014.6.24）
- ・ファインセラミックス国際標準化推進協議会主催「ISO/TC 150（外科用インプラント）とバイオセラミックスの国際標準化の状況」講演会にて「医療機器に関連した国際標準化状況について：ISO/TC 150（外科用インプラント）を中心に」のタイトルで講演（2015.1.27）
- ・（一財）日本規格協会における平成 26 年度第 2 回 ISO 国際標準化研修 上級編（実践コース）で「国際幹事経験談及び医療機器分野国際標準化の現状について」のタイトルで講演

（2015.1.28）

D. 考察

1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設

現在、再生医療と呼ばれるものが実用化にまで至ったケースは数少なく、米国で自家培養表皮、自家培養軟骨が 1997 年に製造販売承認を得てから、新規の製品として実用化に至った例は数える程である。我が国においても、J-TEC が 2007 年に自家培養表皮、2012 年に自家培養軟骨の製造販売承認を取得したが、それ以外の製品は未だ上市されていない。培養表皮に関する研究が 1970 年代に開始されたことを鑑みると、我が国におけるその実用化には 30 年を要したことになる。また、軟骨に関しても、実用化に繋がった研究が開始してから 20 年以上の時間を要しており、それらの事実からも、再生医療等製品の実用化を加速するための環境整備が必要であることが示唆される。そのためには、「再生医療等製品」の特性を理解し、その種類を明確にしておく必要があると思われる。

単純に「再生医療」と言っても、その種類は様々であるため、そのことを理解せず一括りに考えようとすると、それらの安全性、性能評価が難しくなる。「再生医療」が時代の脚光を浴びたのは、1993 年に Nature で「人の耳を背中にもつマウス」が発表されたことに溯る。これ以降、終末分化した細胞と人工物（Scaffold）、増殖因子等を組み合わせ、組織再生を試みる研究が活発化した。その成果の一つが J-TEC の自家培養軟骨である。

一方、培養皿を化学的に加工して細胞をシート状に回収する技術も進み、そのシートを疾患治療に用いるための研究も

進んでいる。前述の研究と違うのは、最終製品に人工物が存在しないことであるが、この研究も元々は工学研究者による細胞と人工物との複合体を利用した組織再生研究が出発点であるため、上記同様、細胞と人工物との相互作用が安全性の面からも重要視された。現在、この研究を基にした虚血性心疾患治療用ヒト骨格筋芽細胞シートは治験段階に、角膜障害治療のための角膜上皮（幹）細胞シートは治験前相談が終了しているとの情報があるが、それらが上市されるにはまだまだ時間を必要とする状況である。

上記 2 種類とは異なるアプローチとして、細胞のみを用いて組織再生を行う「細胞治療」研究が存在する。従来から、幹細胞や ES 細胞、終末分化細胞を用いて同様の研究は行われており、癌治療のために患者から取り出した樹上細胞を体外で培養して人為的に癌抗原を提示させた後に患者に戻す Provenge、重度のしわを修復する LaViv 等が米国でバイオロジクスとして実用化されているが、未だに我が国では同等の製品は実用化されていない。（注：バイオロジクスとしては、造血系再構築を目的とした細胞治療製品が複数品実用化されているが、これらは骨髄移植等に代わるものであり、再生医療とは趣を異にするものであるため、ここでは言及しない。）しかしながら、2014 年に、我が国において細胞治療製品の第一例となり得る、移植片対宿主病（GVHD）抑制を目的としたヒト間葉系幹細胞製剤の製造販売承認申請が為された。さらに、iPS 細胞の樹立成功により、細胞治療による再生医療研究が活発化し、多くの公的研究資金も投下されているが、iPS 細胞を用いた製品の实用化にはまだ時間を要する

のが現状である。

このように、国内外において上市されている再生医療等製品は数えるほどであり、且つ海外展開を行っている企業は存在しない。それにも関わらず、ISO の複数の TC、SC で再生医療の stakeholder らが集まり国際規格の作成を行っていることは、将来の海外展開を見据えた戦略を準備している国や企業があることを示唆している。とりわけ、各 TC での活動に米国 FDA 関係者が積極的に関与していることから、産業化を先行させ自国規格を実質上の国際標準とする「デファクト」手法を重視してきた米国が、再生医療等製品においては「デジュール」標準重視へとシフトしつつその国際標準化における主導権を握ろうとしていることを示している。なお、他の医療機器関連 TC でも同じような動きが見られていることから、この米国の国際標準化に対する方針変更が全ての分野に広がっている可能性も否定できないが、少なくとも「再生医療等製品」分野を含む医療分野全般に及んでいることが考えられる。

上述したように、我が国の再生医療等製品で製造販売承認を得たものは 2 品目のみであり、その他は未だに治験や臨床研究の段階であることから、再生医療等製品の国際標準化にまで目が行き届かない面がある。しかしながら、実用化までの時間はまだ必要なものの、我が国発の万能細胞である iPS 細胞を利用した製品開発が進んでいることから、知的財産権との効率的な併用を考慮しつつ将来展開を見越した「デジュール」規格の作成を戦略的に進めていかなければならないと考える。作成された国際規格が実際に規制当局に利用されるか否かは別に議論し

なければならないが、少なくとも我が国がこの分野で主導権を握っていくためには stakeholder 間で情報及び認識を共有しつつ、戦略的且つ統一的に再生医療等製品の国際標準化に取り組んでいかなければならないことが明確となった。そのために直面する問題として、以下の2点が挙げられる。

1. 先述したように、「再生医療等製品」に相当するものは大きく分けて2つ（細胞単独による細胞治療、あるいは細胞と人工物、薬剤とを複合化した組織工学製品）存在するが、その点に関する理解・区別が stakeholder の間で共有されていない。
2. 複数の ISO/TC で再生医療等製品に相当する分野の標準化が試みられており、その作業が各々独立して進んでいる。

1 は、現在、再生医療に携わる研究者が、先述した再生医療等製品の種類を明確に理解しないまま、各々の背景を中心に研究を進めるために生じている問題である。

再生医療等製品の実用化においては、細胞治療研究者の多くが、細胞のみを研究対象とした「製品」の開発が可能と考えている様子が見受けられる。しかしながら、細胞治療においても、製品化に伴う工学技術（培養関連装置、保存装置等）が重要であることは明らかである。また、現在、実用化されている多くの再生医療等製品は、細胞と人工物との複合品からなる「組織工学製品」であり、この場合には細胞のみならず、人工物、さらにはそれらの相互作用解析を基にした品質、安全性及び有効性評価が必要となる。こ

のように、細胞治療と組織工学製品、いずれにおいても工学技術が関与する度合いが高い。両者の品質、安全性及び有効性を考慮するためには、両者を明確に区別した上で、各々の製造工程・特性を鑑みた各種評価方法の構築が必要となるが、その際、工学的視点からの評価方法構築も重要となる。よって、現在、再生医療研究に携わっている全ての研究者が、携わっている研究の種類、特性を明確に理解した上で、他分野の研究者と密に情報交換や共同研究を行わなければこの問題は解決せず、再生医療等製品の迅速な実用化や関連技術の国際標準化は進展しないと考えられる。今後、関連学会同士の密な連携の構築等、何らかの対策を講じて問題を解決する方法を模索していく必要がある。

2 に示したように、現在、複数の ISO/TC で再生医療等製品関連の標準化が試みられているが、これまでに ISO で発行された再生医療等製品関係の標準は ISO 13022 のみである。この原因の一つとして、この分野における human resource が不足していることが挙げられる。事実、TC 150/SC 7 において、標準化提案は複数行われているものの、作業開始にまで至った案件は活動年数に比べて少ない。その原因は、ISO の規程で定められている作業開始に必要な expert が集まらないためである。現在、標準化に積極的関与している国としては、我が国以外には米国、ドイツ、中国、韓国、ブラジルが挙げられ、いずれの国においても研究自体は活発であるが、標準化のための Expert 選任には苦勞しているのが現状である。よって、ISO における当該分野の標準化活動を集約し、human resource を有効に使う必要性があ

ると考えられる。

ISO 13022 は、様々な議論を経た結果、対象となる細胞は終末分化細胞のみとなり、再生医療等製品において重要なツールである各種幹細胞は対象となっていない。そのため、幹細胞の取扱いが改定時の論点となることが予想される。現在、幹細胞を含む細胞の品質及び安全性に関しては、IABS でも議論が行われているものの、IABS によるそれらの標準化を目指している様子は認められない。しかしながら、WHO をその議論に巻き込んでいることから、IABS での議論を反映させた WHO ガイドランスの発行を最終目標にしていると思われる。そのため、ISO 13022 の改定時に幹細胞を対象とする方向で議論を行うことは、IABS の活動と重複する可能性を孕んでいる。現在、国策として推進されている健康・医療戦略において、医療分野における規制に利用可能な国際標準化の作成推進が掲げられていることを鑑みると、適切な戦略の元、国内関係者間で事前に意見調整を行い両者の業務切り分けや共同作業を提案する等の活動を行えば、それを足がかりに ISO/TC の集約や human resource の有効な再配置に繋がり、この分野における国際標準化を我が国が主導できる可能性がある。他国に先立って活動できるこの機会を逃してはならないが、関係者間でそのような戦略を立てるための組織がまだ構築されていないのが現状である。

現在、我々は、再生医療等製品と関連した標準化作業を行っている TC 150/SC 7、TC 194/SC 1、TC 198、TC 276 国内委員会関係者及び関係省庁関係者との間で、再生医療等製品に関する国際標準化に関して統一した方向性と連動性を共有するた

めの連携体制構築に、非公式ながら取り組み始めている。この活動が、今後の再生医療等製品関連の国際標準作成を戦略的な All JAPAN 体制で行うための土台となることを、我々は期待している。

医療機器ソフトウェアの標準化も、現在、米国が主導権を握ってその作成を行っていることが示唆される調査結果を得た。しかしながら、医療機器としての標準化にも拘わらず、ISO 側では主に情報系専門家で形成される TC 215 が関わっており、医療機器の特性を考慮しない規格が作成されるのではないかとこの点が危惧された。医療機器業界側でも同様の点を危惧しているようであり、その解決のため、TC 215、あるいは joint WG にメンバーを送り込んでいることが明らかとなった。また、ISO 13485 の改訂に伴い医療機器ソフトウェアが QMS の対象となりうること、その際の引用規格が非常に多くなることから医療機器ソフトウェアの製造工程管理が非常に複雑化する可能性が示唆された。このことは、ソフトウェアを必要とする医療機器にとっても非常に大きな変更になることから、ISO 13485 の改訂状況を注視していく必要があると思われる。

ISO 13485 の改訂に関しては、先述した変更点についての議論も紛糾しているが、日本を含めた数の国が反対票を投じた大きな原因は ISO 13485 の親規格である ISO 9001 が現在改訂されていることが挙げられる。この改訂版は、2015 年中に発行される可能性があることから、以下のような懸念が存在している。

- ・ 用語の定義、項立てが改訂されているため、現在改訂中の ISO 13485 と齟齬が生じてしまう

- ・ 結果として、ISO 13485 の改訂版を発行しても、すぐに ISO 9001 に合わせた改訂が必要になる

そのため、二度手間を恐れた多くの国が反対票を投じたことが考えられる。改訂作業がさらに遅れることになったことから、上記の懸念は増大しており、2回目の DIS 投票においてその改訂が受け入れられるかどうかは未だに不透明である。

国内では、医薬品医療機器法が施行されたことに伴い、QMS 省令も修正され現行の ISO 13485 との整合性が高められたばかりである。よって、上記改正が成立した場合、近い将来、QMS の国際整合の再考慮が課題となる可能性がある。よって、医療機器ソフトウェアのみならず、医療機器分野全体の課題として ISO 13485 の改訂内容を注視していかなければならないと考える。

医薬品医療機器等法の施行に先立って、医療機器の基本要件基準も改正され、第2章第12条第2項に「プログラムを用いた医療機器については、最新の技術に基づく開発のライフサイクル、リスクマネジメント並びに当該医療機器を適切に動作させるため確認及び検証の方法を考慮し、その品質及び性能についての検証が実施されていなければならない」と明記された。このことは、医療機器ソフトウェアに関する国際標準を何らかの形で規制に取り込むことを示唆している。事実、この規定は3年間適用されないが、取扱いについては国際規格の取扱いも含め今後検討が必要と報告されている。よって、ISO 13485 のみならず、現在改訂中の IEC 62304 を中心とした医療機器ソフトウェア関連国際規格が規制においても重要に

なることは明らかであり、我が国も産官学共同でこれらの規格作成に積極的に関与しなければならない状況になっていることが示唆されている。

2) 国際標準化に対する啓蒙活動

昨年度、実施したアンケート結果で、医療機器企業関係者への啓蒙活動が必要であることが明らかとなったことから、医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙する目的で、4回、発表・講演を行った。今回行った講演は、それぞれ研究センター、学会、標準化関連団体、ISO 活動支援団体が主催したものであり、それぞれ国際標準化に関する興味の高さは異なるものの、講演後の質疑で多数の質問が出たことから、その重要性をある程度啓蒙することができたと思われる。

アンケート結果で、企業内にも潜在的には国際標準化の重要性を感じている方々が多いことが示唆されていたことから、企業を対象とした講演を実施できなかった面で啓蒙活動は十分ではなかったと思われる。よって、医療機器産業界を対象に同様の取り組みを行い、関係者、特に、企業上層部に直接国際標準化の必要性を訴えていく等の活動を実施することが、今後の課題となった。

E. 結論

1) ISO/TC 共通窓口の試験的開設

昨年度同様、「再生医療等製品」と「医療機器ソフトウェア」にテーマを絞り込み、現在行われている国際標準化活動状況を取りまとめた。その結果、前者では製品開発に先行して「デジュール」規格の作成が始まっており、複数の ISO/TC で関連技術の国際標準化作成作業が活発化

していること、後者においてはその標準化がQMSをも巻き込み複雑化しているが、その鍵となるISO 13485の改訂が滞っていることが明らかとなった。前者においては、我が国が主導権を握れる分野であり、製品の実用化に先立って「デジュール」規格作成が活発化していることから、製品カテゴリーの明確化やAll JAPAN体制を構築して戦略的な活動を実施しなければならないことが明らかになった。後者においては、ソフトウェアを内包する医療機器も含め、その規制が厳しくなる可能性があることも示唆されたが、鍵となるISO 13485の改訂が遅れていること、それに伴いその内容に変更が生じる可能性が示唆された。ISO 13485の改訂は、我が国におけるQMS省令へも影響を及ぼす可能性があること、ソフトウェア関連国際標準をどのように規制に取り入れていくかを検討している段階であることから、今後、我が国も積極的にその作成に関与していかなければならないことが示唆された。

2) 国際標準化に対する医療機器関連企業の意識調査

医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙する目的で、計4回、医療機器関連団体等を対象に研究発表、講演を行った。その結果、ある程度医療機器分野における国際標準化の重要性を啓蒙することができた。

F. 研究発表

1) 中岡竜介、薮島由二、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)．

2) 中岡竜介、薮島由二、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) 中岡竜介．医療機器に関連した国際標準化状況について：ISO/TC 150(外科用インプラント)を中心に．「ISO/TC 150(外科用インプラント)とバイオセラミックスの国際標準化の状況」講演会(2015年1月・東京)

4) 中岡竜介．国際幹事経験談及び医療機器分野国際標準化の現状について．平成26年度第2回ISO国際標準化研修上級編(実践コース)(2015年1月・東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

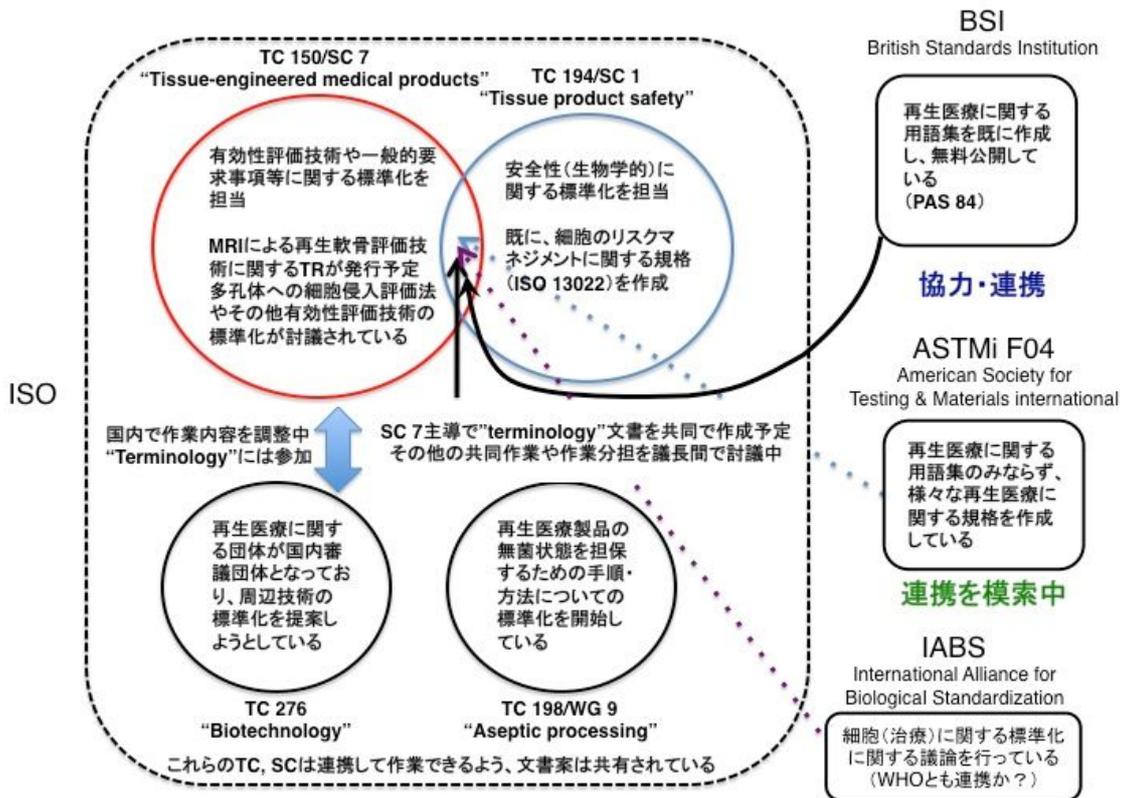
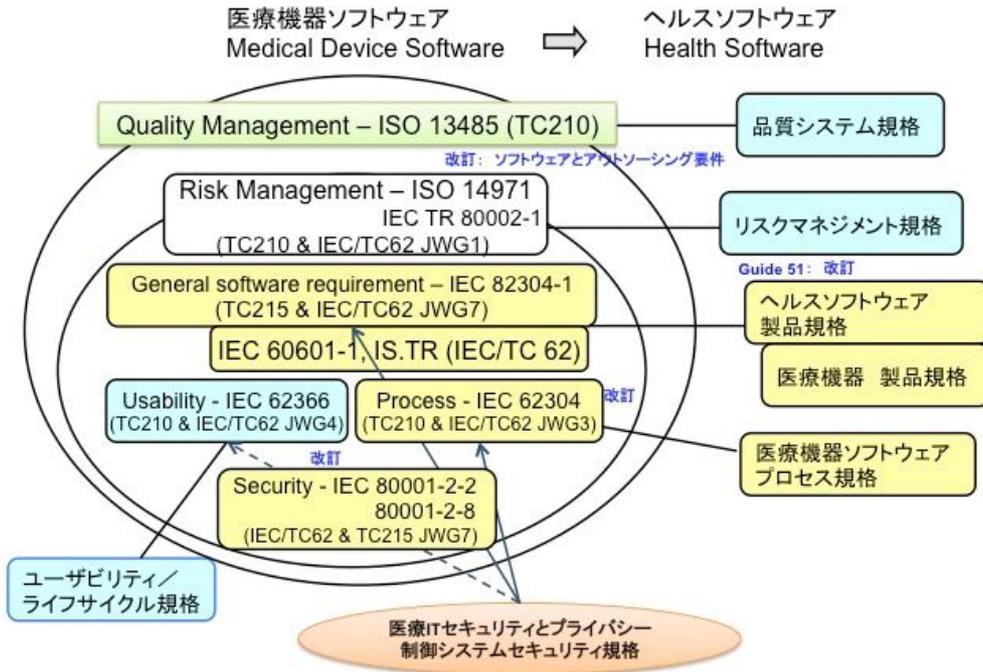


図1. 再生医療等製品関連規格の現状 (2015年版)

医療機器ソフトウェアの参照国際規格の状況



IEC/TC 62 Software and Networks Advisory Group (SNAG)国内支援委員会 資料より(一部改変)

図2. 医療機器ソフトウェア関連規格の現状(2015年版)

分担研究報告書

平成 26 年度厚生科学研究費補助金（地球規模保健課題推進）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

歯科用 CAD/CAM によるセラミック加工法等の国際標準化に関する研究

研究分担者 大熊 一夫 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科理工学講座

研究協力者 鮎島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
蛸原 善則 株式会社ジーシー
Somchai Urapepon マヒドン大学（タイ）

研究要旨

本研究では、「国際標準化機構 (ISO) 及び国際電気標準会議 (IEC) における医療機器の各種国際規格の策定に関する研究 (H23-地球規模-指定-003)」において策定した「医療機器規格・基準の国際標準化戦略に係る政策的提言」を具体的に実行する一環として、新規規格の提案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ため、歯科分野におけるケーススタディを実施した。

歯科界で注目されている医療機器である歯科用 CAD/CAM に関する規格を ISO/TC106/SC9 に日本から新規提案し、CD 化に至るまでの情報を収集した。本規格は、平成 25 年度 ISO/TC106 総会（インチョン会議）における新規提案を経て、平成 26 年 6 月に CD 案「Machining accuracy of computer-aided milling machines -Test methods」の投票が行われ、賛成 9 カ国及び反対 3 カ国の結果をもって採択された。同年 9 月に開催された ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議では、Convener として、5 カ国によるインターラボラトリーテストの結果報告及び各国から提出されたコメントに対応した。また、本 CD に新たな CMM 及びソフトウェアを追加することが提案され、2nd CD ヘステージを進めた。

A. 研究目的

金属アレルギーの問題や金属の高騰から、厚生労働省は脱金属を提唱し、新しい修復用材料の開発を熱望している。一つの答えがセラミック材料である。しかし、セラミックスは修復材料としては、脆弱過ぎる。そこで、高強度セラミックスとして、ジルコニアセラミックスが開発された。ジルコニアセラミックスは本焼結すると、1200 vH (エナメル質：350vH) に達し、通常の切削は困難である。また、焼結による収縮が 30%にも達するため、精度の高いジルコニアセラミッククラウンは修復物の三

次元データを 30%拡大し、半焼結状態のジルコニアセラミックブロックから切削加工し、加工後本焼結することにより作製される（図 1）。ジルコニアセラミッククラウンを作製するために不可欠な機械が CAD/CAM である。歯科用 CAD/CAM は、1985 年にスイス・チューリッヒ大学のグループが、世に送り出した。日本国内では数年後に通産省 / NEDO (新エネルギー・産業技術総合開発機構) 傘下のプロジェクトとして、「次世代オーラルデバイスエンジニアリングシステム」(1993~1996 年) が実施された。国内に視点を向けても、平成 26

年4月に、CAD/CAM 冠として CAD/CAM が歯科診療報酬に初めて組み込まれた。このように、歯科分野において世界的に最も注目されている医療器機が CAD/CAM である。

本研究では、新規規格の提案を通じて国際標準化に必要な戦略を収集することを目的として、歯科分野においてケーススタディを実施した。近未来に歯科界のリーダーシップを獲得するため、平成 22 年から準備を開始し、新しい SC (SC9 : CAD/CAM systems) の設立 (平成 23 年フェニックス会議/Plenary) 事前説明 (平成 24 年パリ会議) を経て、平成 25 年に新規規格「Machining accuracy of computer-aided milling machine -Test methods」を日本から正式に提案した (インチョン会議/Ad-hoc 5/暫定 Convener)。平成 26 年度のベルリン会議では、SC9/WG5 を Convener として開催し、CD に対する各国からのコメントに対応し、本規格の国際標準化を目指して活動した。

B. 研究方法

(1) ケーススタディ

1-1. 歯科用 CAD/CAM によって作製したセラミック修復物の加工精度の評価方法を国際標準化に関する研究

1-1-1. インターラボラトリーテスト

平成 25 年度 ISO/TC106/WG5 会議 (インチョン会議) において、タイと日本で実施した新規規格に準じて行った実験結果を報告し、実現可能な規格であることを報告した。そこで、CAD/CAM で作製したセラミック修復物の精度の評価方法の理解や改善のため、米国、タイ、ドイツ、スウェーデン及び日本の 5 カ国でインターラボラトリーテストを行うことになった。新規規格に記載した寸法の 1 級インレー

用、2 級インレー用、クラウン用及びブリッジ用金型から三次元データを取得し、切削用三次元データに変換し、半焼結ジルコニアセラミックブロックから CAD/CAM マシンを用いて修復物を作製した。作製した修復物を金型に装着し、金型と修復物の変位量を測定し、修復物の精度の評価を行った。

1-1-2. 測定のための印記

インチョン会議において、1 級インレー及びクラウンのような上面像が正対称の修復物の場合、測定を行う上で試料に印記する必要性が話題となった。そこで、最初の測定点を 0° とし、修復物と金型との変位量を測定した。同様に、 45° 、 90° 、 135° 、 180° 、 225° 、 270° 、 315° 毎に試料を回転させ、計 8 点における修復物と金型との変位量を測定した (図 2)。

1-1-3. CAD/CAM 材料の被切削面

歯科用修復物の外面及び内面の表面粗さは、修復物の臨床的寿命に大きく影響する。切削加工後の表面粗さは、被切削材料や切削加工条件 (Dry/Wet, 加工ピッチ速度, 仕上げ代量, 切削工具の種類, 送り速度及び工具回転数) が主な要因となる。そこで、一定加工条件下における 4 種類の修復物材料 (ジルコニア未焼結、ジルコニア本焼結、コンポジットレジン及び純チタン) の被切削表面の画像を取得し、加工痕を評価した。通常、表面粗さの評価には表面粗さ計を用いるが、国際標準としての利用価値を高めるため、容易にデータを取得できる画像による解析法を採用した。ジルコニア未焼結の加工は Dry 条件下、加工ピッチ 0.1mm、仕上げ代 0.1mm、ジルコニア用ダイヤコート、

送り速度 500mm/min、工具回転数 2500min⁻¹で行い、ジルコニア本焼結、コンポジットレジン及びチタンにおいても同一の加工条件で切削した。加工状態は被切削面を観察することにより評価した（加工痕が明確な場合：加工条件が不適切，加工痕が明瞭でない場合：加工条件が適切）。

1-1-4. ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議

WG5 (Machined devices) に Convener として出席し、インターラボラトリーテストの結果報告及び各国からのコメントに回答した。また、CMM 及ソフトウェアによる精度の測定方法が米国から提案された。

1-1-5. 倫理面への配慮

ヒト又は動物を用いた試験を実施しないため、非該当である。

C . 研究結果

(1) 歯科用 CAD/CAM によって作製したセラミック修復物の加工精度の評価方法を国際標準化に関する研究

1-1-1. インターラボラトリーテスト

インターラボラトリーテストには米国、タイ、ドイツ、スウェーデン及び日本の5カ国が参加したが、ベルリン会議までに作業が完了し、結果の報告に至った国はタイと日本のみであった。タイのクラウンと金型の変位量の測定結果は、ジルコニアセラミックスで平均 +0.08mm、コンポジットレジンで+0.50mm、ワックスで+0.08mm であった。日本のジルコニアセラミックスで作製した精度は+0.005mm であった。この差は変位量の測定機器の限界によるものである。

加工精度は、被切削材料に影響をされるが、日本から提案した方法により評価

できることが確認された。

1-1-2. 測定のための印記

1 級インレーと金型との変位量の平均は+0.962mm であり、クラウンの場合は+0.422mm となった。1 級インレーとクラウンの標準偏差は、それぞれ 0.074 及び 0.024 であり、変位量平均値の 1/10 程度の小さい値であった。また、測定回数（この場合角度が大きくなる）が多くなるほど、修復物と金型の変位量が減少する傾向が認められた（図 3）。これらの成績から、測定のための印記は必要性ないことが確認された。

1-1-3. CAD/CAM 材料の被切削面

同一加工条件下におけるジルコニア未焼結、ジルコニア本焼結、コンポジットレジン及び純チタンの被切削表面の画像を図 4 に示した。

ジルコニア未焼結 (a) とジルコニア本焼結 (b) の被切削面を比較すると、ジルコニア本焼結の被切削面の中心部に十字用の大きな工具による痕が残ると共に、切削加工中に工具が破損する等、適正な加工条件でないことがわかる。一方、ジルコニア未焼結 (a) は切削工具の痕が認められず、適正な被切削面であることが確認された。同様に、コンポジットレジン (c) は適正な被切削面、純チタン (d) は不適正な被切削面であることが確認され、被切削面から適切な切削加工条件を評価できることが判明した。

1-1-4. ISO/TC106/SC9/WG5 ベルリン会議

6 月に CD の投票が始まり、8 月に CD 投票が締め切られた。その結果、賛成 9 カ国、反対 3 カ国（オーストラリア、ブラ

ジル及びスウェーデン)、棄権 2 カ国をもって、本 CD は採択された。

反対票を投じたオーストラリアとスウェーデンは本 CD が「加工機の精度に特定した評価法」であることを理解しておらず、「システム全体」の評価法として誤認している可能性が考えられたため、事前の国内委員会において、「序文及び適用範囲」を修正した。国際会議にあたり、本修正版を事前に各国エキスパートへ回付した。

ベルリン会議は各国から寄せられたコメントに対する回答で始まった。会議中、概ね日本の提案については合意が得られたが、日本提案の金型を用いた測定方法でなく、CMM (Coordinate Measuring Machine: 三次元測定機) 及び三次元の元データと CAD/CAM で作製したセラミック修復物の三次元データの変位量の差を求めるソフトウェア法が米国から提案された。この結果、これらの項目を追加した 2nd CD にステージアップすることになった。

D . 考 察

平成 26 年度は、CAD/CAM で作製したセラミック修復物の測定精度を向上させるための治具 (図 5) を作製し、インターラボラトリートテストに利用した。特に、2 級インレーの治具では、咬合面と側方の両方から 50N の荷重を同時に加えることができるようになり、測定精度が格段に向上した。今回行った実験 (1-1-2 項) において、試料を 45° 毎に回転させて計 8 点の各金型との変位量を測定する場合、一定の小さい定点に定荷重を加えることが可能であり、精度の高い測定結果を得ることができた。

従来、CAD/CAM で作製したクラウン及びブリッジと金型の変位量を測定する場合、試料を手指で把持してノギスを用いて計測していた。そこで、測定精度の向上及び測定時間の短縮を図るため、レーザ計測を応用した測定機を考案し、作製した (図 6,7)。この装置では、修復物と金型の変位量を随時測定することが可能であり、精度の高い測定結果を得ることができた。

ベルリン会議において、スウェーデンのエキスパートは経験が浅く、日本からの提案を理解できなかった。また、スウェーデンはインターラボラトリートテストに参加表明し、測定用金型を提供したにも拘わらず、試験成績を報告しなかったのは非常に残念な結果である。

一方、反対を投票したオーストラリアは、事前回付した修正版の内容を理解し、日本提案を受け入れた。国際標準化を円滑に進めるためには、国際会議における丁寧な説明、会議資料の提供や各国エキスパートに対するロビー活動が非常に重要であることを再確認した。また、米国代表団長の Mrs. Sharon が本会議の議事録の作成にも援助してくれる関係を築いていたので、会議がスムーズに進行した。

ベルリン会議中、概ね日本の提案については合意が得られたが、日本提案の金型を用いた測定方法でなく、CMM 及びソフトウェアを利用する方法が米国から提案されたため、現在、これらの項目を追加した 2nd CD を作成している。2015 年 3 月末までに SC9 事務局に送付した後、2nd CD 投票が行われる予定である。

E . 結 論

インターラボラトリートテストの結果、

CAD/CAM により作成されたセラミック修復物の加工精度は、日本が提案した CD 「Machining accuracy of computer-aided milling machine -Test methods」により正しく評価できることが確認された。また、ベルリン会議（平成 26 年 9 月）における討議の結果、本提案規格に CMM とソフトウェアを追加して 2nd CD ステージに進めることとした。

国際会議では、会議前の丁寧な説明及び会議資料の提供により、各国からの信頼を得ることが重要である。また、日本から提案した医療技術を国際標準化する一つの道は、WG の Convener を獲得することである。

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表等

- 1) Koide M, Ohkuma K, Ogura H, Miyagawa Y. A new method for fabricating zirconia copings using a Nd:YV04. Dental Materials Journal, 33:422- 429 (2014).
- 2) 小出未来, 大熊一夫, 小倉英夫, 宮川行男 Nd:YV04 レーザを用いたジルコニアコーピングの新しい加工法 被照射面の熱処理後のラマン分光分析. 日本歯科理工学会第 63 回春季学術講演会 (2014 年 4 月・千葉).
- 3) 赫多 清, 大熊一夫, 宮川行男. 陶材の咬合摩耗に及ぼす試験片支持材料の影響. 日本歯科理工学会第 64 回秋期学術講演会 (2014 年 10 月・広島).

参照資料

- 1) 第 50 回 ISO/TC106 会議報告書。2014 年 (通巻 35 号). 日本歯科材料器械研究協議会 2015 年 1 月 13 日.

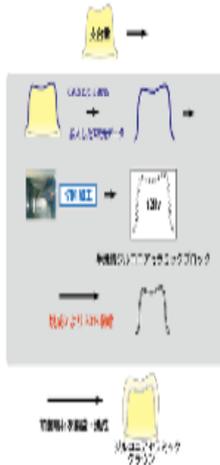


図1. ジルコニアセラミッククラウンの作製行程

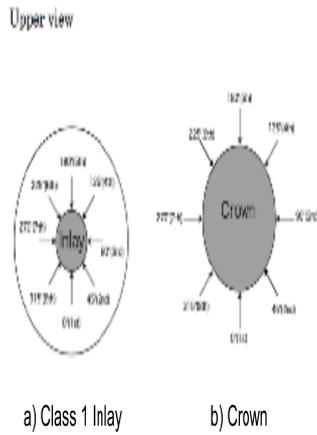


図2. 各修復物の測定点

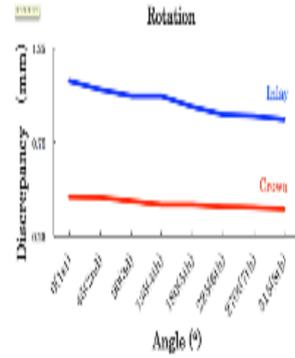


図3. Influence on discrepancy by the measurement position



図4. 被切削材料の加工後の表面

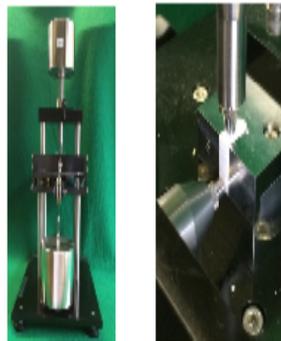


図5. 定荷重試験機



図6. クラウンの変位量測定器(全景)



図7. クラウンの変位量測定

別添1

© ISO 2014 – All rights reserved

ISOTC 106/SC 9WG 5 N 12

Reference number of working document: **ISO/TC 106/SC 9 N 12(replace N10 国内)**

Date: 2014-08-02

Reference number of document: **ISO/CD 18845.2**

Committee identification: ISO/TC 106/SC 9

Secretariat: **JISC**

Dentistry – CAD/CAM systems – Machining accuracy of computer-aided milling machines – Test methods

Medicine bucco-dentaire –

Warning

This document is not an ISO International Standard. It is distributed for review and comment. It is subject to change without notice and may not be referred to as an International Standard.

Recipients of this draft are invited to submit, with their comments, notification of any relevant patent rights of which they are aware and to provide supporting documentation.

Document type: International standard
 Document sub-type: if applicable
 Document stage: (D) Committee Draft
 Document language: E

Revised CD 18845

Copyright notice

This ISO document is a working draft or committee draft and is copyright-protected by ISO. While the reproduction of working drafts or committee drafts in any form for use by participants in the ISO standards development process is permitted without prior permission from ISO, neither this document nor any extract from it may be reproduced, stored or transmitted in any form for any other purpose without prior written permission from ISO.

Requests for permission to reproduce this document for the purpose of selling it should be addressed as shown below or to ISO's member body in the country of the requester.

ISO copyright office
 Case postale 56 CH-1211 Geneva 20
 Tel: +41 22 749 01 11
 Fax: +41 22 749 09 47
 E-mail: copyright@iso.org
 Web: www.iso.org

(as appropriate, of the Copyright Manager of the ISO member body responsible for the secretariat of the TC or SC within the framework of which the draft has been prepared)

Reproduction for sales purposes may be subject to royalty payments or a licensing agreement.

Violators may be prosecuted.

© ISO 2014 – All rights reserved

Revised CD 18845.2

Contents

	Page
Foreword.....	iv
Introduction.....	v
1 Scope.....	1
2 Normative references.....	1
3 Terms and definitions.....	1
4 Requirements.....	1
5 Test methods.....	1
5.1 Target restorations.....	1
5.2 Apparatus.....	1
5.3 Preparation of three-dimensional data.....	2
5.4 Machining of restorations.....	4
5.5 Evaluation of accuracy.....	5
5.5.1 General.....	5
5.5.2 Class I inlay.....	エレーブックマークが定義されていません。
5.5.2.3 Class II inlay.....	5
5.5.34 Crown.....	7
5.5.45 Four-unit bridge.....	9
6 Test report.....	10

© ISO 2014 – All rights reserved

分担研究報告書

平成 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

研究協力者

野村祐介	国立医薬品食品衛生研究所	坂口圭介	テルモ株式会社
福井千恵	国立医薬品食品衛生研究所	谷川隆洋	テルモ株式会社
中村義一	株式会社リボミック	杉山知子	テルモ株式会社
宮川 伸	株式会社リボミック	竹ノ内美香	テルモ株式会社
金 玲	株式会社リボミック	新藤智子	食品薬品安全センター
柚場俊康	川澄化学工業株式会社		

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 2 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国際ラウンドロビンテストを支援するため、2 種類の弱陽性対照材料 Genapoli X-080 含有 PVC シート (Y-2, Y-3) を本試験用標準品として提供した。Y-2 及び Y-3 は本試験においても良好な溶血特性を示し、その性能が世界的に確認されたことから、今後、ISO/TC194/WG12 に国際標準品として新規提案する。材料開発分野におけるケーススタディでは、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を行った。その結果、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。

A . 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けるケーススタディを実施している。

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)を支援している。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

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、平成26年度に本試験が実施された。

過去に行ったパイロット試験において、WG9が配布した弱陽性対照材料は標準品として十分な性能を発揮しないことが確認された。そこで、我々が開発した2種類の弱陽性対照材料（Genapol X-080含有PVCシート¹⁾）を提供し、ミニテストを実施した結果、良好な成績が得られたため、国際ラウンドロビンテストの本試験用標準品として、全参加国に配布した。

材料開発分野におけるケーススタディでは、機能性蛋白質を選択的に補足するRNAアプタマーを用いた革新的医用材料の開発研究を行っている。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。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。通常、材料表面への蛋白質吸着は受動的であり、その吸着挙動は材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。成長因子等の生理活性物質や抗体を固定化し、特定の機能を付与した表面も開発されているが、現在のところ、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アプタマー医薬品候補を検索する際、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。RNAの生体内寿命は非常に短い、相応の化学修飾を施すことにより、その寿命を延長することが可能となる。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補足し、その機能を一定期間に渡り制御できる可能性が非常に高い。また、抗体や増殖因子等と異なり、RNAアプタマーは単独では生理活性を示さない合成可能な化学物質である利点もある。そこで材料開発分野における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を特異的に補足するRNAアプタマーを選定すると共に、RNAアプタマー固定化材料を作製し、その機能を解析した。

B. 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、ESB0 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0.4mm）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²⁾(直接接触及び抽出液法): 3 時間、NIH 法³⁾(直接接触法): 1 時間、MHLW 法^{4,5)}(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 114002A、テルモ/承認番号 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: RNA アプタマーを用いた革新的医用材料の創製

3-1. bFGF を捕捉する RNA アプタマー材料開発

昨年度選定した bFGF 捕捉型 RNA アプタマー(1p01)及び陰性対照である poly dT

(pdT) は、ジーンデザインに合成を委託し、末端に 3'-アミノ CA リンカーを付加した。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。作製した両ガラス版を 70% EtOH に浸漬後、風乾させて殺菌し、細胞培養用 24 ウェルプレートに設置した。培地としては DMEM 及び MSCGM を使用し、血清は 5% ヒト血清 (HS) 及びウシ胎児血清 (FBS) を用いた。各培地で 30 分間プレインキュベーションした後、マウス線維芽細胞 (NIH3T3: 5.4×10^3 cell/well) 又はヒト間葉系幹細胞 (hMSC: 9.0×10^3 cell/well) を播種し、5% CO₂ 雰囲気下 37 °C で培養した。hMSC は培養開始から 2 日後、NIH3T3 は培養開始 3 日後に固定化し、Hoechst 33258 (Ex=360 nm, Em=460 nm) により染色後、BZ-9000 を用いて核数を計測することにより、細胞増殖能を評価した。

3-2. BMP2 を捕捉する 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 結合能を有する RNA アプタマー候補の選定は、BMP2 をアミノカップリングさせた NHS 樹脂を用いる SELEX 法により行なった。テンプレート DNA、フォワードプライマー及びリバースプライマーはジーンデザインに合成委託し、これらを用いて RNA プールの転写合成を行なった。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 DuraScribe T7 Transcription Kit (エアブラウン) を用い、転写反応を行なった。転写産物を簡

易精製し、SELEX buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 145 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) 条件下で tRNA 等の競合物質と共に BMP2 固定化樹脂と混合し、結合した RNA を回収・精製した。回収した RNA を逆転写反応により DNA に戻し、PCR によって増幅させ、DNA を精製した。この DNA を用いて再度転写を行なうことにより、次のラウンドの RNA プールを合成した。このサイクルを合計 10 ラウンド繰り返し、最終ラウンドの PCR 産物を TOPO ベクターにクローニングし、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することで、RNA アプタマー候補を取得するための評価を行った。得られた候補配列について、プログラム Mfold 及び RNAfold を用いて二次構造解析を行ない、BMP2 結合に重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) 及び表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて評価した。

EMSA では Mg イオンの有無の違いによる影響を評価するために、TB (89 mM Tris, 89 mM Borate) 及び TBM (89 mM Tris, 89 mM Borate, 1 mM MgCl₂) を泳動用緩衝液として使用した。RNA と BMP2 の混合比は 1:0 及び 1:5 とし、12% 非変性 PAGE によって RNA アプタマー候補と BMP2 の結合能を評価した。

SPR 解析は BIAcore3000 を用いて行ない、ランニング緩衝液及びセンサーチップとして、それぞれ SELEX buffer 及びストレプトアビジン固定化チップ (SA チップ)

を使用した。同チップに 5'末端ビオチン標識 pdT (16 nt) を 100 Resonance Unit (RU) 程度結合させた後、リガンドとなる 3'末端に Poly A を付加した候補 RNA を poly A/pdT 間の相互作用を利用して SA チップに固定化した。候補アプタマーと BMP2 との結合能は同チップを利用して評価した。

C. 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
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、国内施設が行った試験結果を示す。

1-1. 陰性対照及び強陽性対照の試験結果

図 1a に示したとおり、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 (図 1b)。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 (図 1b)。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. 弱陽性対照材料の試験結果

図 2a に示したとおり、LG の溶血特性を最も感度良く検出できる試験法は NIH/直接接触法であり、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/直接接触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。

図 2b に示したとおり、BR の溶血特性は ASTM/直接接触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/直接接触法及び 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。

図 3a に示したとおり、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、直接接触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/直接接触法と 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（図 3b）。直接接触法による検出感度は抽出液法と比較して低く、ASTM/直接接触法及び NIH/直接接触法における溶血率（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：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

昨年度、bFGF の生理活性を阻害せずに bFGF を捕捉する RNA アプタマー候補である 1p01、1p02 及び 2p03 を選定した。また、金コートしたガラス板表面に PEG5k を介して pdT を固定化させることにも成功している。そこで、金コートしたガラス板に PEG5k 及び 1p01 又は pdT を固定化した材料が及ぼす細胞増殖能への影響を評価した。

bFGF 捕捉型 RNA アプタマー1p01 及び陰性対照である pdT をコートした材料上で細胞培養を行なった結果、5% HS 条件下では培地の種類を問わず、NIH3T3 及び hMSC とともに、1p01 コート材料上で培養した方が高い増殖能を示すことが確認された（図 4）。また、5% FBS/DMEM 培地条件下で hMSC を培養した場合にも、1p01 コート材料は増殖促進作用を示したが、5% FBS/MSCGM 培地条件下の場合、1p01 及び pdT コート材料は同等の増殖能を示した（図 5）。

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った後、ClustalW を用いたグルーピング解析を行なった結果、BMP2 と結合する RNA アプタマー候補は 5 種類（B10, B20, B24, B32, B37）の配列に収束されていることが明らかとなった。B10, B20, B24, B32 及び B37 の出現頻度は、それぞれ 6.9%, 16.9%, 8.5%, 45.1%及び 12.7%であり、B32 が最も多く観測されていた。この 5 種類の候補についてプログラム Mfold 及び

RNAfold による二次構造解析を行なった結果、それぞれ図 6 に示し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 RNA アプタマー候補と BMP2 の結合能を EMSA により評価した結果、二価イオン非存在下では、BMP2 を添加することにより、スミアな複合体バンドが観測された。一方、 Mg^{2+} イオン存在下で EMSA を行なった結果、B10 及び B24 については、明瞭な複合体バンドが観測された（図 7）。

BIAcore を用いた SPR 法による解析の結果、RNA アプタマー候補に BMP2 を添加することにより、例外なく RU 値の上昇が確認されたことから、5 種類の RNA アプタマー候補は、いずれも BMP2 に結合することが判明した（図 8）。

D. 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 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増殖因子である bFGF 及び BMP2 を捕捉する 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 捕捉型 RNA アプタマー-1p01 及び陰性対照である pdT を材料表面上に固定化し、両材料上で細胞培養を行なった。その結果、5% FBS/MSCGM 培養条件下の場合、hMSC の増殖能は pdT 及び 1p01 間に顕著な相違は観察されなかった。この現象は、hMSC 増殖用に最適化された MSCGM 培地に含まれる増殖因子が同細胞に優先的に作用し、RNA アプタマーによる効果が減弱したことに由来すると思われる。一方、その他の培養条件下においては、陰性対照である pdT と比較して、1p01 コート材料表面上で細胞数が多く観測されていることから、同材料は細胞増殖促進効果を有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行うと共に、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実施することにより、医用材料としての有用性を検証する。

BMP2 に対する RNA アプタマーを用いた新規骨充填剤の開発を目指し、SELEX 法により BMP2 に結合する RNA アプタマー候補の選定を行なった。得られた RNA アプタマー候補の解析を行なった結果、5 種類の配列に収束していたが、共通の構造モチーフが認められなかったことから、各候補はそれぞれ特有の構造を有していることが示唆された。RNA アプタマー候補と BMP2 の相互作用を EMSA によって解析した結果、 Mg^{2+} イオンの有無により、その挙動が異なっていた。B10 及び B24 は Mg^{2+} イオン存在下において、明瞭な複合体バンドとして検出された。これは、 Mg^{2+} イオンが両 RNA アプタマー候補と BMP2 の結合に密接に関与することを示唆している。一般的な機能性 RNA の構造形成には二価の金属イオンが関与する場合が多く、ヒト IgG に対する RNA アプタマーにおいても複合体形成に Mg^{2+} もしくは Ca^{2+} イオンが必要となっている。一方、SPR 法による相互作用解析において、SELEX 法と同様に二価又は一価の金属イオンを添加した条件下で評価した結果、5 種類の RNA アプタマー候補は BMP2 に対して、40N ランダム配列よりも強い結合能を有することが確認された。本研究において使用した SELEX の条件下では、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 及び Na^+ イオンが共存しているため、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有する可能性も示唆された。また、EMSA 及び SPR 解析において、40N ランダム配列の RNA は非常に弱い BMP2 結合能を有することが確認されたが、この現象は BMP2 に存在する塩基性アミノ酸に富んだ正電荷領域と、負電荷を帯びている RNA との非特異的な静電相互作用に由来すると思われる。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保存された構造モチーフが確認されないと共に、相互作用解析における挙動が異なることから、それぞれが異なる機構で BMP2 と結合していることが示唆された。RNA アプタマーを利用した医用材料の開発に応用するためには、BMP2 の生理活性を阻害しない配列が必要であるため、今後、5 種類全ての RNA アプタマー候補を用いて、BMP2 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 アプタマー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。

E . 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 : 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。

F．健康危険情報
特になし。

G．研究発表等

- 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) 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)．
- 6) 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）．
- 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) 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）．
- 9) 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）．
- 10) 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¹，新見伸吾．新規血液バ

ツグ素材 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).

参照資料

1. Haishima Y, Hasegawa C, Nonura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, and Niimi S. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. J. Biomed. Mater. Res. Part B, 102B:1809-1816 (2014).
2. ASTM Standard F756-08:2008. Practice for assessment of hemolytic properties of materials. ASTM International, West Conshohocken, PA.
3. National Institute of Health: 1977. Evaluation of hemodialyzers and dialysis membranes. <Hemolysis-Rabbit Blood> DHEW Publication 77- 1294. Bethesda, MD.
4. 平成 24 年 3 月 1 日付け薬食機発 0301 第 20 号: 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「医療機器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」.
5. Japanese domestic committee of ISO/TC 194. Haemocompatibility test. In: Matsuoka M, Editor-in-chief. Basic principles of biological safety evaluation required for application for approval to market medical devices (bilingual in Japanese and English). Tokyo: Yakuji Nippo, Ltd.; 2013. p189-203.

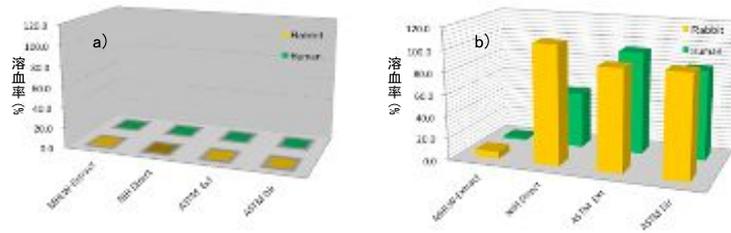


図1. 陰性対照材料及び陽性対照材料の溶血特性. a) PE, b) NG.

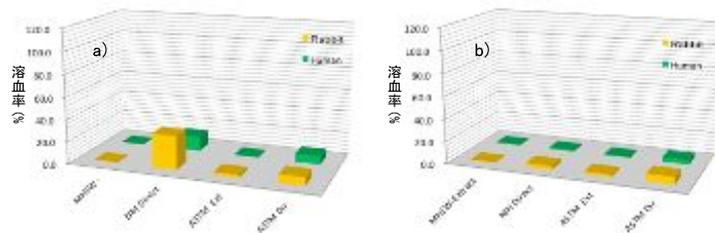


図2. 弱陽性対照材料の溶血特性. a) LG, b) BR.

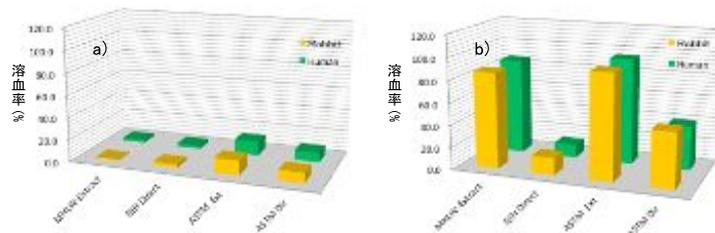


図3. 弱陽性対照材料の溶血特性. a) Y-2, b) Y-3.

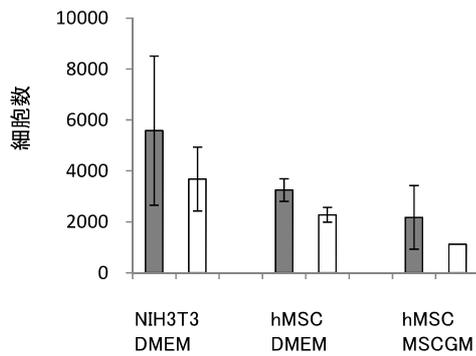


図4. アプタマー材料の細胞増殖能への影響評価 (5% HS). 黒:1p01, 白:pdT.

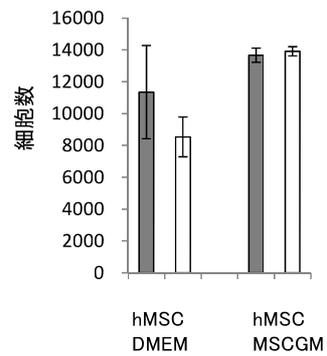


図5. アプタマー材料の細胞増殖能への影響評価 (5% FBS). 黒:1p01, 白:pdT.

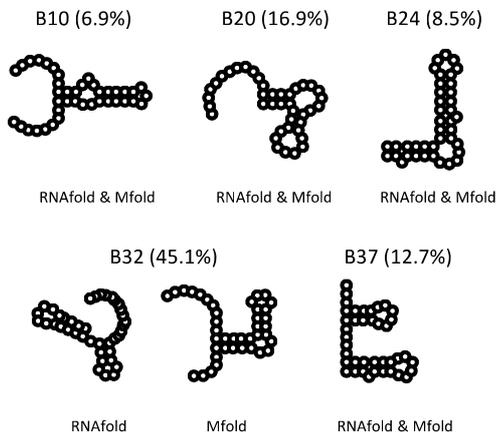


図6. SELEX法によって得られたRNAアプタマー候補の出現頻度と二次構造予測結果

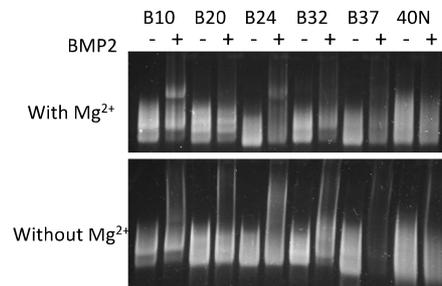


図7. EMSAによるRNAアプタマー候補とBMP2の相互作用解析

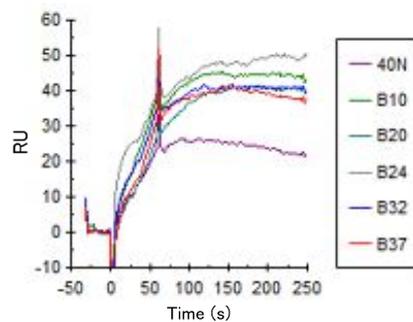


図8. SPR法によるRNAアプタマー候補とBMP2の相互作用解析

(別添5)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Koide M, Ohkuma K, Ogura H, Miyagawa Y	A new method for fabricating zirconia copings using a Nd:YVO4	Dental Materials Journal	33	422-429	2014
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
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

<p>薮島由二</p>	<p>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</p>	<p>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</p>		<p>3-21</p>	<p>2014</p>
<p>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</p>	<p>Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers.</p>	<p>J. Vinyl Add. Technol.</p>	<p>in press</p>		<p>2015</p>