

図10 PS粒子取り込みの様子

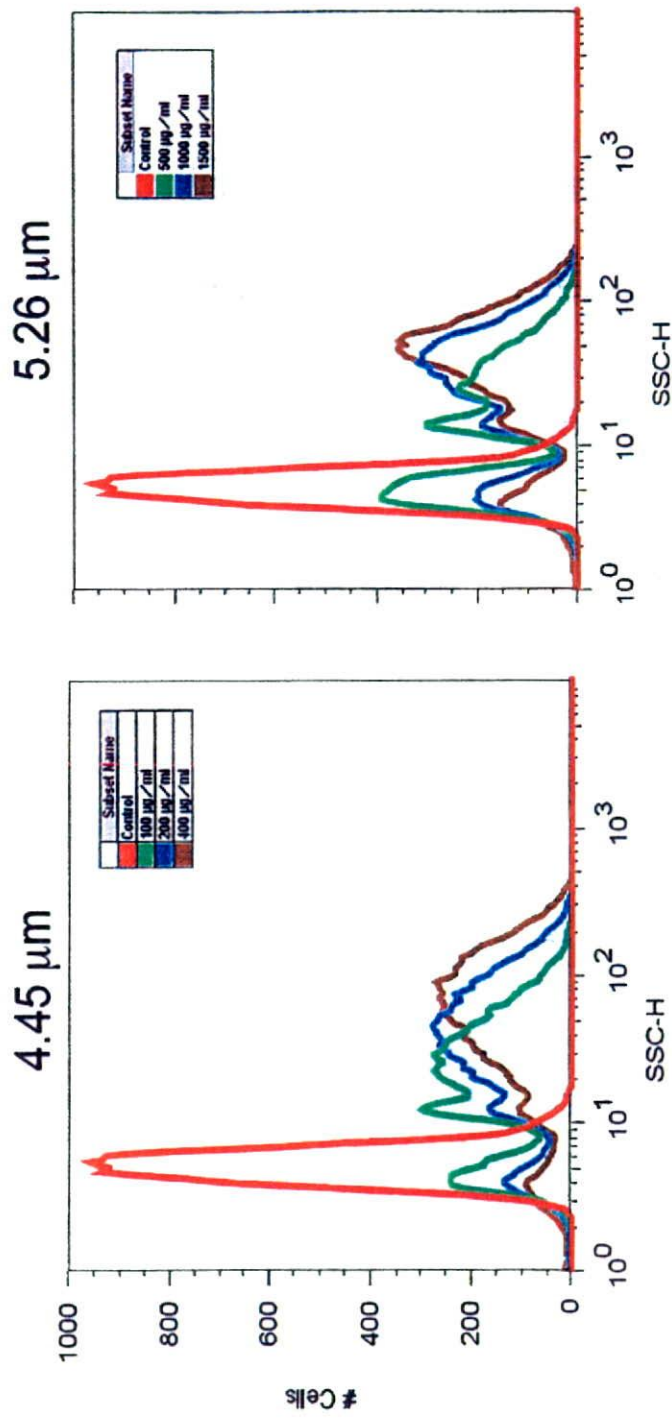


図11 フローサイトメトリによるPPS粒子取り込み細胞の半定量化



図12 抜去の際についたと思われる傷の例 (OUH001)



図13 人工股関節大腿骨コンポーネントのゆるみによると思われるステム部の傷の例 (OUH005)

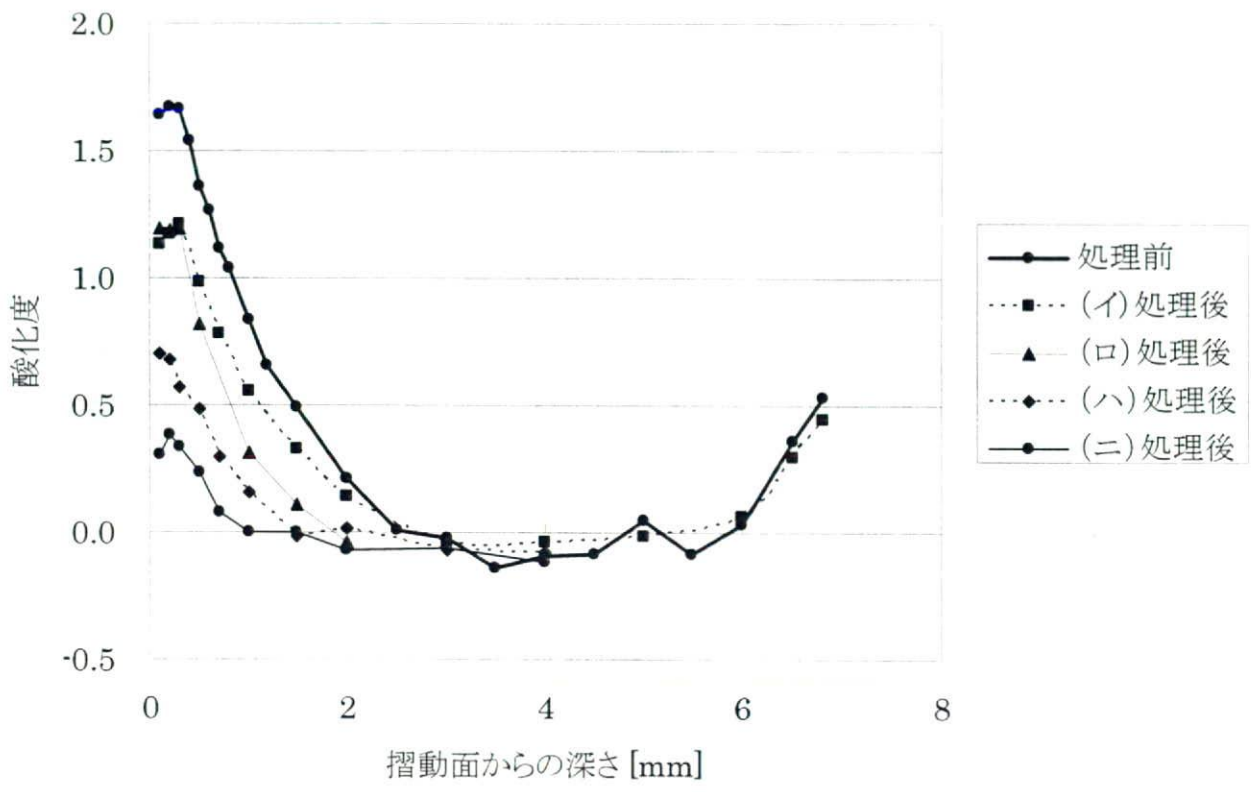


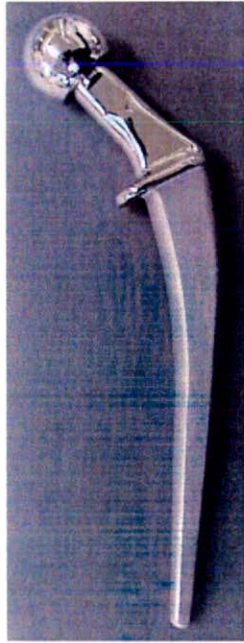
図 1 4 脂質除去工程による酸化度測定への影響の例 (OUH004)

表4 現在までに入手した抜去インプラントの一覧

症例番号	対象部位	型式	コンポーネント			
OUH001	人工股関節	パイポーラ	アウターヘッド	ライナー	骨頭	大腿骨ステム
OUH002	人工股関節	パイポーラ	アウターヘッド	ライナー	骨頭	大腿骨ステム
OUH003	人工股関節	人工股関節	メタルシェル	ライナー	骨頭	大腿骨ステム
OUH004	人工足関節	-	脛骨コンポーネント	インサート	距骨コンポーネント	-
OUH005	人工股関節	パイポーラ	アウターヘッド	ライナー	骨頭	大腿骨ステム
OUH006	人工股関節	パイポーラ		ライナー		
OUH007	人工股関節	パイポーラ	アウターヘッド	ライナー		
OUH008	人工股関節	パイポーラ	アウターヘッド	ライナー		

表5 FTIR による分析結果の一覧

	トランス ビニレン指数	推定照射量 [kGy]	結晶化度 [%]	最大 酸化度
OUH001	0.000	-1	64	1.30
OUH002	0.010	27	66	1.16
OUH003	0.000	-1	61	1.03
OUH004	0.000	-1	61	1.67
OUH005	0.013	36	67	0.65



4-U 人工股関節
(ナカシマメディカル株式会社)



計測による形状モデル

図 15 形状測定の対象とした人工股関節と計測データに基づく形状モデル.

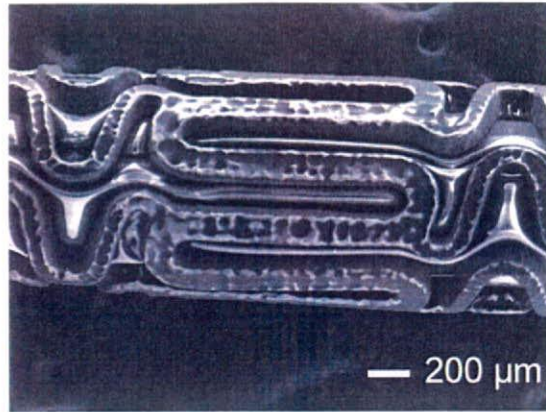
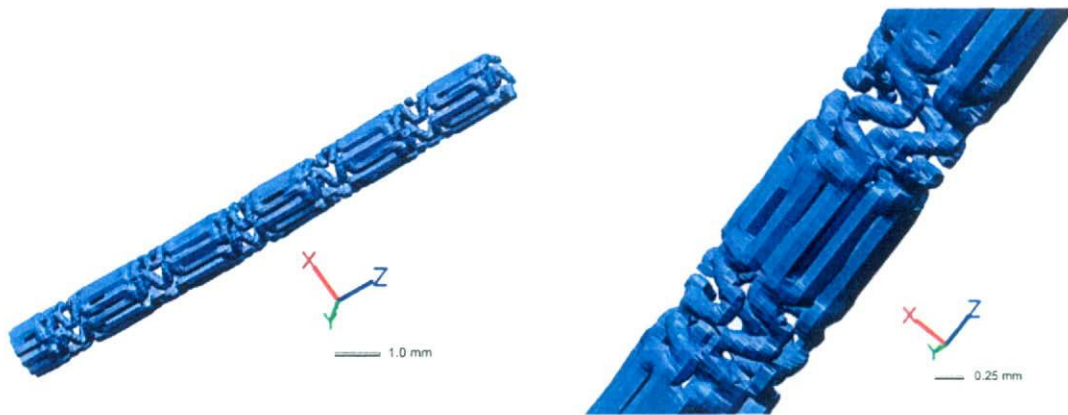


図 16 血管内ステント (CYPHER ステント).



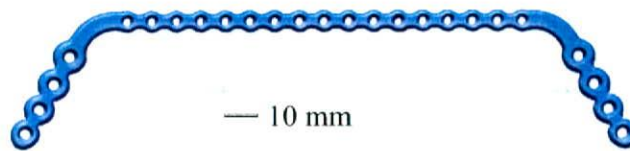
全体図

拡大図

図 17 マイクロフォーカス X 線 CT による血管内ステントの形状測定結果.



(a) 歯科用骨固定材 (Stryker 社, 56-28087).



(b) 三次元形状測定により作成した形状モデル

図 18 今回測定対象とした歯科用骨固定材と作成した形状モデル.

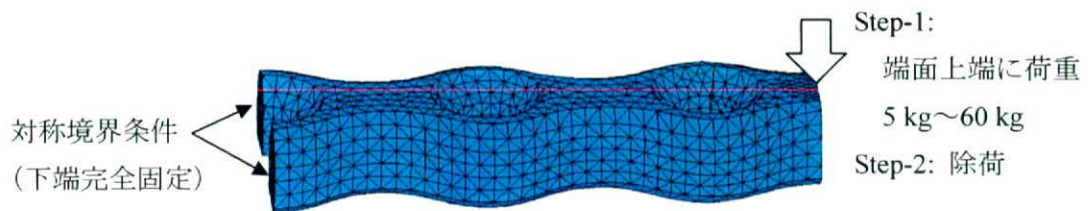


図 19 境界条件

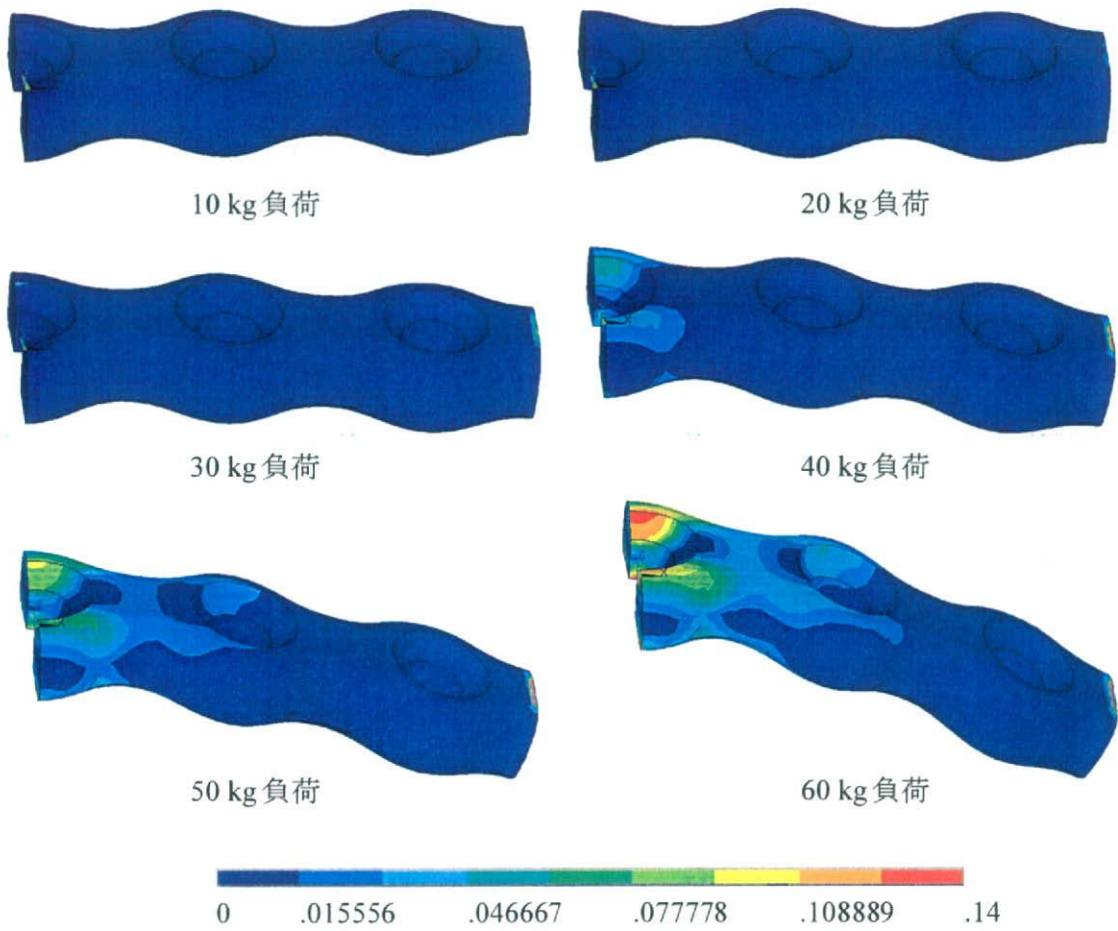


図 2 0 相当塑性ひずみ分布.

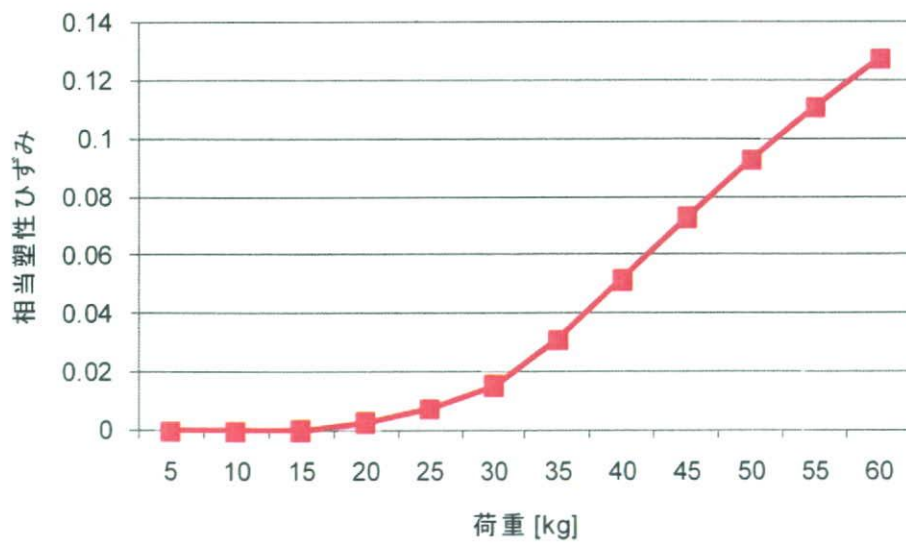


図 2 1 最大相当塑性ひずみの推移

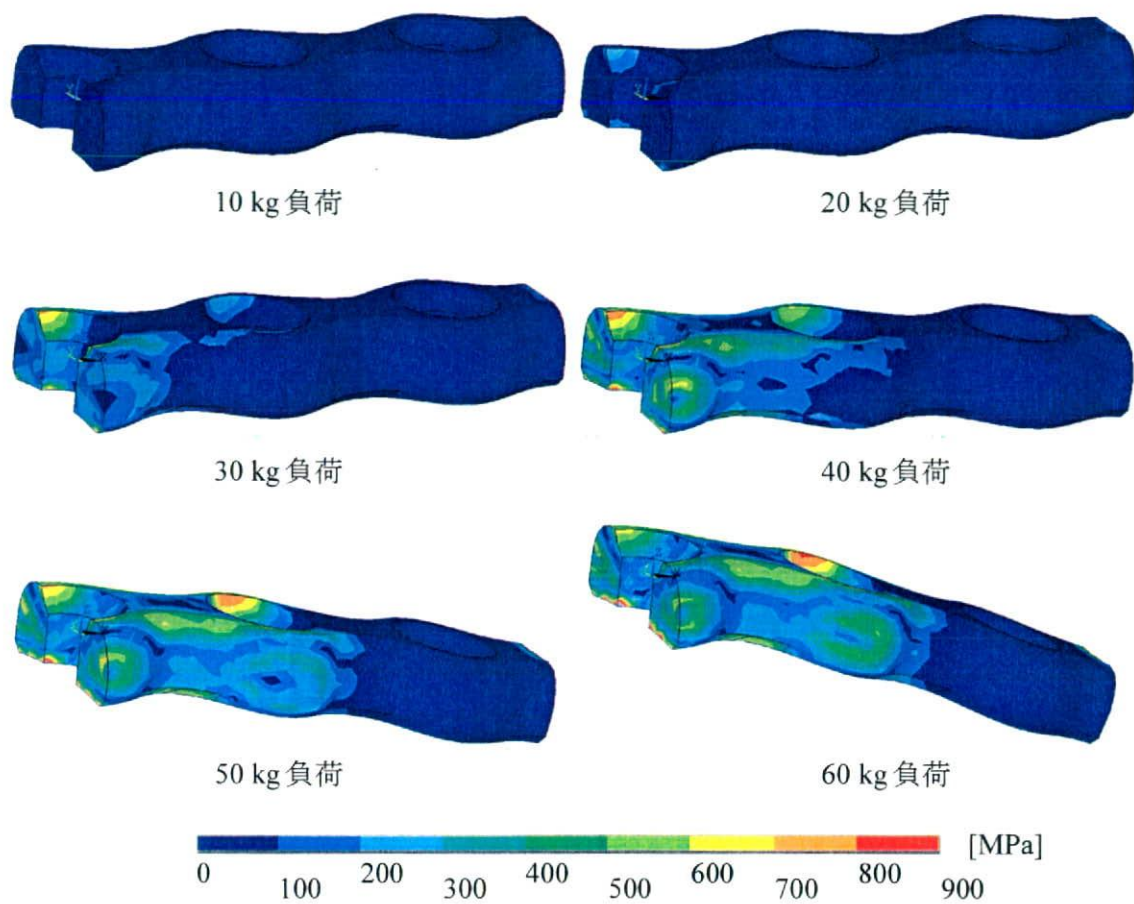


図 2 2 残留応力（ミーゼス相当応力）分布．変位は除荷後の状態を表示している．

II 分担研究報告

1. プロテオミクス解析による医用材料の
リスクアセスメント手法開発

藪島 由二

分担研究報告書

平成 20 年度厚生科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合）研究事業
「医療機器・医療材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究」（H19-医薬一般-015）

分担研究課題名

プロテオミクス解析による医用材料のリスクアセスメント手法開発

主任研究者	土屋 利江	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
分担研究者	龍島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
協力研究者	伊佐間和郎	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
	松岡 厚子	国立医薬品食品衛生研究所 療品部
	長谷川千恵	国立医薬品食品衛生研究所 療品部

研究要旨

本研究では、医用材料の機能や生体適合性を評価する手法として、プロテオミクス解析の有用性について検討している。平成 19 年度の本研究では、表面にスルホン基を共有結合させたポリスチレン製細胞培養プレート（スルホン化プレート）がヒト正常骨芽細胞（NH0st）に対して分化促進機能を示すことを見出した。また、同プレート上で培養した NH0st の遺伝子発現解析を行った結果、培養初期から培養後期の各段階において、種々の成長因子が NH0st の分化進行に関与していることを明らかにした。

平成 20 年度の本研究では、NH0st への影響を蛋白質レベルで解析した。スルホン化プレート吸収血清を用いた培養系では、NH0st の増殖能及び分化能ともに低下することが確認された。同プレートに吸着した蛋白質は全血清蛋白質の 0.4%程度に相当し、二次元電気泳動解析において血清蛋白質とは明らかに異なる泳動パターンを示した。スルホン化プレートに吸着する蛋白質のショットガン解析を行った結果、成長因子関連蛋白質（IGF2、IBP2、TFBR3）、細胞外マトリックス（COMP、HABP2、FINC、CO1A）のほか、NH0st の分化に重要な役割を果たしている TETN、MIME、骨代謝関連蛋白質として SPP24、VTDB など興味ある蛋白質が同定された。

以上、スルホン化プレートが示す NH0st の分化促進機能とプロテオミクス解析結果の間には密接な相関性が認められた。今後、これらの蛋白質が及ぼす NH0st への影響を詳細に検討すると共に、細胞レベルの蛋白質発現解析などを行うことにより、医用材料のリスクアセスメント手法としてプロテオミクス解析が応用できるかどうか総合的に評価する予定である。

A. 研究目的

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。これは、医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面（バイオインターフェース）で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで

で生体蛋白質の吸着が起こる。細胞は材料表面上で構造変化した吸着蛋白質を介して材料に接着することにより、最終的な生体反応を誘導する。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。

医用材料の蛋白質吸着については、血栓形成や細胞接着等に着眼した研究が行われてきたが、材料に吸着する蛋白質の種類を網羅的に解析し、

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

そこで本研究では、近年、機能性材料の1つとして注目されているスルホン化材料の作用機序を分子レベルで解明することを通じて、プロテオミクス解析が医用材料のリスクアセスメント手法として利用できるかどうか評価している。平成19年度に実施した予備的研究では、表面にスルホン基を共有結合させたポリスチレン製細胞培養プレート（スルホン化プレート）がヒト正常骨芽細胞（NH0st）に対して分化促進機能を示すことを見出した。また、同プレート上で培養したNH0stの遺伝子発現解析を行った結果、成長因子に対する応答を制御する機能を持つZFP36L1遺伝子の発現量が培養開始後2時間目に顕著に上昇することが確認された。その他、IGF関連遺伝子（IGFBP4、IGFBP7、IGF2、IGF1R、IRS2）、TGF- β 関連遺伝子（ACVR1C、TGFB2、TGFB3）、BMP及びTGF- β スーパーファミリー遺伝子（GDF5、GDF15）や、NRP1、STAT2及びWISP1遺伝子の発現量も早期に上昇するなど、培養初期から培養後期の各段階において、種々の成長因子がNH0stの分化進行に関与していることを明らかにした。

平成20年度の本研究では、これらの知見を基礎として、スルホン化プレートが及ぼすNH0stへの影響を蛋白質レベルで解析した。

B. 研究方法

(1) スルホン化プレートの調製

Wakabayashiらの報告に従い、住友ベークライト社製（SUMILON）のポリスチレン製細胞培養用24ウェルプレート及びポリスチレン製細胞培養用トレイ（22.5 x 22.5 cm）に濃硫酸（和光純薬、超微量分析用）を添加した後、37°Cで4時間インキュベートした¹⁾。処理後、水道水、重曹水及び蒸留水により順次洗浄し、乾燥後、クリーンベンチ内でUVを10分間照射して滅菌した。

(2) 吸収血清の調製と蛋白質の回収

スルホン化トレイに25 mlの牛胎児血清を添加し、4°Cで24時間緩やかに振とうした後、回収してスルホン化プレート吸収血清を調製した。一連の操作は全て無菌的に行った。未処理の細胞培養用トレイを使用して同様の操作を行い、対照吸収血清を調製した。

上記のスルホン化トレイ及び対照トレイを氷冷した1 mM PBSにより5回洗浄した後、20 mlのSigma社製Chaotropic Membrane Extraction Reagent 3（Reagent 3）を添加し、室温で20分間、緩やかに振とうした。同溶液から冷メタノール沈殿法により粗蛋白質画分を回収し、Reagent 3に溶解後、GE社製2DQuantにより蛋白質量を測定した。得られた粗蛋白質はGE社製Clean Up Kitにより精製し、Reagent 3に再溶解して蛋白質量を測定した後、試験に供するまで凍結保存した。

牛胎児血清5 mlから冷メタノール沈殿法により粗蛋白質画分を回収した後、上記の方法に従って、血清蛋白質試料を調製した。

(3) ヒト正常骨芽細胞の培養

ヒト正常骨芽細胞（CAMBREX, 1D, Female, 0/C）は三光純薬から購入した。培地としては、5 mM β -グリセロリン酸ナトリウム、10 nM デキサメタゾンのほか、10%の牛胎児血清、スルホン化トレイ吸収血清及び対照吸収血清をそれぞれ含有する α -MEM（GIBCO）培地を使用した²⁾。細胞培養

用プレートとしては未処理及びスルホン化処理を施した 24 ウェルプレートを使用し、1 ウェル当たり 4×10^4 個のヒト正常骨芽細胞を播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で種々の期間培養した。

(4) 増殖・分化能の測定

ヒト正常骨芽細胞の増殖度は、30 μ l/ml の生細胞測定用試薬 TetraColor ONE (生化学工業) を含有する培地 (1 ml) に交換し、37°C で 2 時間インキュベート後、150 μ l の培養上清を 96 穴プレートに分注し、450 nm (対照波長: 600 nm) における吸光度を測定して評価した²⁾。プレートリーダーとしては、BIO-TEK INSTRUMENTS, INC. 社製 μ Quant を使用した。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性は、TetraColor ONE 含有培地を廃棄し、PBS (pH 7.2) で 1 回洗浄後、4 mM パラニトロフェニルリン酸、10 mM MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂ を含有する 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.5) 1 ml を各ウェルに添加し、37°C で 15 分間インキュベート後、上清 150 μ l を 96 穴プレートにサンプリングし、405 nm (対照: 600 nm) での吸光度を測定して評価した²⁾。

(5) 二次元電気泳動

蛋白質の蛍光標識 (minimal labelling 法) 及び二次元電気泳動は Ettan DIGE 簡易マニュアル (GE 社製) に記載された標準プロトコールに従って実施した³⁾。

血清蛋白質及びスルホン化トレイ吸着蛋白質各 50 μ g を常法に従って、還元 (DTT)、アルキル化 (ヨードアセトアミド) した後、血清蛋白質は Cy3、スルホン化トレイ吸着蛋白質は Cy5 により蛍光標識した。また、等量 (各 25 μ g) の両蛋白質を混合し、還元・アルキル化した後、Cy2 標識して内部標準試料とした。上記の全ての標識蛋白質を混合して試料とし、電気泳動に供した (n=3)。

一次元目の等電点電気泳動は、GE 社製ドライ

ストリップ (3-11NL, 24 cm) を使用して、同社製 IPGphor II により行った。回収したドライストリップは平衡化した後、二次元目の SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は、バインドシラン処理された DRC 社製低蛍光プレキャストゲル (12.5%, 20 x 26 cm) を使用し、GE 社製 DALT6 システムにより行った。

二次元電気泳動終了後、GE 社製 Typhoon 9400 により蛍光画像を取り込み、DeCyder 2D ソフトウェアを利用してデータ解析及びピッキングリストの作成を行った。

ピッキング用試料として、還元・アルキル化したスルホン化トレイ吸着蛋白質 150 μ g を CyDye 標識することなく、同スケールの二次元電気泳動に供した。泳動終了後、ゲルを固定及び DeepPurple (GE 社製) により蛍光染色し、Typhoon 9400 を使用してイメージを取り込んだ。DeCyder 2D ソフトウェアを利用して先に泳動した CyDye 標識ゲル (Cye 5 画像) とマッチングした後、ピッキングリストに従って、アズワン社製 ProHunter を用いてスポットを分取した。

(6) ショットガン解析

6-1. In-Solution Digestion

還元・アルキル化した血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質 (各 50 μ g) を含む Reagent 3 溶液 8 μ l に 50 mM NH₄HCO₃ (87.2 μ l)、プロメガ社製 ProteaseMax Surfactant (1%, 3 μ l) 及び Trypsin Gold (1 μ g/ml, 1.8 μ l) を添加し、37°C で 3 時間インキュベーションした後、10% TFA 5.25 μ l を加え、室温で 5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドはパリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 μ l) を使用して脱塩し、LC-MS/MS 分析に供した。

6-2. In-gel Digestion

還元・アルキル化したスルホン化プレート吸着蛋白質 (100 μ g) を GE 社製ドライストリップ (3-11NL, 24 cm) を使用して等電点電気泳動し

た。ドライストリップを2 cm 間隔（酸性側から Zone 1-11）で切断し、各断片を更に細かく裁断した後、エッペンチューブに取り込み、50 mM NH_4HCO_3 (400 μl)、アセトニトリル/50 mM NH_4HCO_3 (1:1 v/v, 400 μl) 及びアセトニトリル 400 μl で順次洗浄し、サーモフィッシャー社製 Speed Vac を使用して乾燥させた。Trypsin Gold (12 ng/ μl) 及び Protease Max Surfactant (0.025%) を含む 50 mM NH_4HCO_3 溶液 30 μl を添加し、氷冷下 30 分間放置した後、30 μl の 0.025% ProteaseMax Surfactant 含有 50 mM NH_4HCO_3 を加え、37°C で 3 時間インキュベーションした。反応液を採取した後、残渣のゲル片を 0.01% ProteaseMax Surfactant 含有 50 mM NH_4HCO_3 (20 μl) 及び 0.01% ProteaseMax Surfactant 含有 1% TFA で順次 5 分間洗浄し、各洗液を先に回収した反応液に加えた。得られたペプチドは OMIX Tip (C18, 100 μl) を使用して脱塩し、LC-MS/MS 分析に供した。

6-3. LC-MS/MS 解析

Nano LC としては、AMR 社製 Magic C18AQ3 μ カラム (100A, 0.075 x 150 mm) 及びトラップカートリッジを接続した AMR 社製 Paladim を使用した。溶離液としては、A 液 (0.1%ギ酸含有 2% アセトニトリル) 及び B 液 (0.1%ギ酸含有 90% アセトニトリル) を使用し、流速 300 nl/min、B 液 5-55%/60 min の条件でグラジエント溶出した。質量分析計としては、nano-spray interface を装備したアプライド社製 QTRAP 4000 を使用し、ESI positive mode により、1 Scan 当たり EMS と MS/MS スペクトル (Top 3/scan) を測定した。データベース解析には、In house Mascot Database を利用した。

C. 研究結果

(1) 血清蛋白質の回収量

牛胎児血清からは 34.1 mg/ml の蛋白質が回収された。スルホン化トレイからは、1 枚当たり

全血清蛋白質の 0.4% 程度に相当する 3,468 μg の蛋白質が回収されたが、未処理の対照トレイから回収された蛋白質量は 4.5 μg であり、対照トレイは血清蛋白質を殆ど吸着しないことが確認された。

(2) 吸収血清を用いた培養実験

通常の牛胎児血清 (未吸収血清)、対照吸収血清及びスルホン化プレート吸収血清を使用して NH0st を培養した時の増殖能及び分化能 (ALP 活性) を評価した。通常の細胞培養プレート上で培養した場合 (Fig.1 下段)、対照吸収血清使用時の増殖能と ALP 活性は未吸収血清使用時と同等であり、両活性ともに経時的に増加したが、スルホン化プレート吸収血清使用時では増殖能及び分化能ともに顕著に抑制されることが判明した。また、Fig.1 上段に示すように、NH0st の分化促進機能を持つスルホン化プレート上で培養した場合でも同様の傾向が認められ、対照吸収血清は未吸収血清と同等の挙動を示したが、スルホン化プレート吸収血清使用時には増殖能及び分化能ともに低下することが確認された。

(3) スルホン化プレート吸着蛋白質の同定

3-1. 二次元電気泳動解析

血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の二次元電気泳動解析結果を Fig.2 に示した。Fig.2A は等量の両蛋白質を混合し、Cy2 で蛍光染色したゲル間マッチング用の内部標準試料である。Fig.2D は Cy3 標識血清蛋白質の泳動像 (Fig.2B) と Cy5 標識スルホン化プレート吸着蛋白質の泳動像 (Fig.2C) を重ね合わせた画像であり、血清蛋白質試料とスルホン化プレート吸着蛋白質試料中に等量存在する蛋白質は黄色スポット、血清蛋白質試料と比較して、スルホン化プレート吸着蛋白質試料中の含有量が高い蛋白質は赤色スポット、逆に血清蛋白質試料に多く含まれる蛋白質は緑色スポットとして検出されている。

血清蛋白質の二次元電気泳動 (Fig. 2B) では、アルブミン (MW=71, 244, pI=5.82) をはじめとした幾つかの蛋白質の含有量が非常に高いため、微量蛋白質のスポットが殆ど検出されていない。一方、スルホン化プレート吸着蛋白質 (Fig. 2C) では、試料中に存在する蛋白質成分のダイナミックレンジが狭まり、血清蛋白質試料において殆ど検出されなかったスポットも顕著に観測されることが判明した。DeCyder 2D ソフトウェアにより解析した結果、血清蛋白質試料と比較して検出量が 5 倍以上増加しているスポット数は 146 個であり、現在、これらの蛋白質の同定作業を進めている。

3-2. LC-MS/MS ショットガン解析

血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の同定を nano-flow LC-MS/MS 解析により行い、その結果を Table 1 から Table 3 に示した。血清蛋白質試料からは、血清中に多量に含まれる ALBU、A2MG、APOA1、APOH、FIBA、TTHY、溶血に由来する HBA 及び HBBF をはじめとして、20 種類の蛋白質が同定された。スルホン化プレート吸着蛋白質試料のショットガン解析では 42 種類の蛋白質が同定され、血清中に存在する雑多な蛋白質のほか、機能性蛋白質 (IGF2、IBP2、TETN) や細胞外マトリクス (CO1A2、COMP、FINC、HABP2) など興味ある蛋白質が検出された。一方、スルホン化プレート吸着蛋白質を等電点電気泳動により分画した後にショットガン解析を行った結果、蛋白質の ID 数は 72 種類まで増加し、ダイレクトショットガン解析において検出されなかった機能性蛋白質及び細胞外マトリクスとして、MIME、TGBR3、SPP24、CO1A1 などが同定された。

D. 考察

平成 19 年度の本研究では、スルホン化プレートに吸着する蛋白質を同定し、NH0st の分化進行に関与すると思われる機能性蛋白質を検索した。スル

ホン化プレート吸収血清を使用した NH0st の培養実験の結果から、NH0st の増殖能及び分化進行に大きく関与する蛋白質群がスルホン化プレートに吸着されることが明らかになった。また、二次元電気泳動解析において、スルホン化プレート吸着蛋白質はオリジナルの血清蛋白質と明らかに異なる泳動像を示した。現時点では非特異的吸着を否定することはできないが、スルホン化プレートは直接又は蛋白・蛋白相互作用を介して特定の蛋白質群を吸着する機能を持つことが示唆された。

IGF や TGF- β などの成長因子は NH0st の増殖と分化に深く関与していることが報告されており⁴⁾、スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析において、IGF 関連蛋白質である IGF2 と IBP2、TGF- β 関連蛋白質である TGBR3 が検出されたことは興味ある知見である。昨年度に実施した遺伝子発現解析において、スルホン化プレート上で NH0st を培養した時、これら 3 種の蛋白質をコードする遺伝子群の発現は早期に誘導されることも明らかになっていることから、各種の成長因子の中でも IGF 群と TGF- β 群が NH0st に対するスルホン化プレートの機能発現に大きく影響していることが示唆された。

骨代謝には様々な蛋白質が関与している。MIME はオステオカルシンと同様に NH0st のアパタイト形成に深く関与する蛋白質である。TETN は NH0st の分化初期に重要な役割を果たしている蛋白質であり⁵⁾、PLMN と親和性を持つことが報告されている⁶⁾。Thiol protease inhibitor としてシステインファミリーに分類される SPP24 は非コラーゲン性の骨蛋白質であり、骨代謝の調節機能を持つことが知られている。また、VTDB は骨成長や骨リモデリングに関与する蛋白質である。

スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析では、上記の成長因子関連蛋白質、骨代謝関連蛋白質及び細胞外マトリクス関連蛋白質のほか、抗アポトーシス作用を示すことが知られている PEDF が検出された。昨年度に実施した遺伝子発現解析においても、培養初期において BCL-2 蛋白質

群をコードする BCL2L11 遺伝子の発現量が上昇していたことから、スルホン化プレート上で培養した NH0st はアポトーシスが抑制されていることが示唆された。

近年、細胞外マトリクスが細胞の増殖と分化に大きな影響を及ぼしており、コラーゲンは増殖促進、フィブロネクチンは分化進行に関与していることなどが明らかになってきた⁷⁾。スルホン化プレート吸着蛋白質のショットガン解析においても CO1A1、CO1A2、FN1 が検出されているが、その他、軟骨系細胞外マトリクスである COMP と HABP2 が同定されたことは非常に興味深い知見である。

スルホン化プレートは NH0st の分化進行を顕著に促進する機能を持つが、スルホン基自体が同細胞に直接的な影響を及ぼしているとは考え難い。現在までに、硫酸化多糖類は BMPs、FGFs、antithrombin III や GM-CSF など相互作用することにより細胞機能を増進させることが示唆されていると共に⁸⁻¹²⁾、本研究においても、スルホン化プレートには NH0st の分化進行に深く関与すると思われる種々の蛋白質が吸着することが明らかになった。これらの知見から、スルホン化プレートが持つ NH0st の分化促進機能はバイオインターフェースに介在する蛋白質により制御されていることが容易に推察できる。今後、本研究において同定された興味ある蛋白質をサプリメントとして添加したスルホン化プレート吸収血清を用いて NH0st の培養実験（レスキュー実験）を行うことにより、同細胞の分化進行を制御する主要な蛋白質を同定することを試みる。また、分子モデリングツールを利用して、スルホン基/蛋白質間相互作用の有無についても検討する予定である。平成 20 年度の本研究では、材料側に吸着する蛋白質の解析を行ったが、次年度はスルホン化プレート上で培養した NH0st の蛋白質発現解析を行い、細胞側の性状変化を追跡する予定である。

E. 結論

スルホン化プレートが示す NH0st の分化促進作用は同プレートに吸着される蛋白質の機能により説明できる結果が得られたことから、プロテオミクス解析は医用材料の機能や生体適合性を評価する上で有益な手法になることが示唆された。今後、候補蛋白質が及ぼす NH0st への影響を詳細に検討すると共に、細胞レベルの蛋白質発現解析などを行うことにより、医用材料のリスクアセスメント手法としてプロテオミクス解析が応用できるかどうか総合的に評価する。

F. 研究発表

- 1) 藪島由二, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 長谷川千恵, 橋本宣子, 脇田比呂美, 中島敏治, 斎藤博久, 松田良枝, 土屋利江. ヒト細胞に対するスルホン化材料の機能解析に関する研究. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2008年11月・東京).
- 2) 藪島由二, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 長谷川千恵, 浅見仁美, 山口透, 土屋利江. スルホン基含有新規温度応答性細胞培養プレートの開発に関する研究. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2008年11月・東京).
- 3) 中岡竜介, 藪島由二, 土屋利江. 種々の官能基表面調製とその細胞挙動への影響について. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2008年11月・東京).

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参照資料

- 1) Wakabayashi Y, Sasaki J, Fujita H, Fujimoto K, Morita I, Murota S-I, Kawaguchi H. Effects of surface modification of materials on human neutrophil activation. *BBA*, 1243:521-528 (1995).
- 2) Isama K, Matsuoka A, Haishima Y, Tsuchiya T. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to

- fibroblast L929 and V79 cells. *Mater. Trans.*, 43:3155-3159 (2002).
- 3) Ettan DIGE 簡易マニュアル: User Manual Proteomics (GEヘルスケアサイエンス).
 - 4) Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.*, 13:2311-2320 (2007).
 - 5) Iba K, Sawada N, Chiba H, Wewer UM, Ishii S, Mori M. Transforming growth factor-beta 1 downregulates dexamethasone-induced tetranectin gene expression during the in vitro mineralization of the human osteoblastic cell line SV-HFO. *FEBS Lett.*, 373:1-4 (1995).
 - 6) Clemmensen I, Petersen LC, Kluft C. Purification and characterization of a novel oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin. *Eur. J. Biochem.*, 156:327-333 (1986).
 - 7) Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.*, 121:255-264 (2008).
 - 8) Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, et al. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*, 278:43229-43235 (2003).
 - 9) Barrowcliffe TW, Johnson EA, Thomas D. Antithrombin III and heparin. *Br Med Bull*, 34(2):143-150 (1978).
 - 10) Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 64(4):841-848 (1991).
 - 11) Rappaegeer AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 252(5013):1705-1708 (1991).
 - 12) Yang R, Yan Z, Chen F, Hansson GK, Kiessling R. Hyaluronic acid and chondroitin sulphate rapidly promote differentiation of immature DC with upregulation of costimulatory and antigenpresenting molecules, and enhancement of NF- κ B and protein kinase activity. *Scand J Immunol*, 55:2-13 (2002).

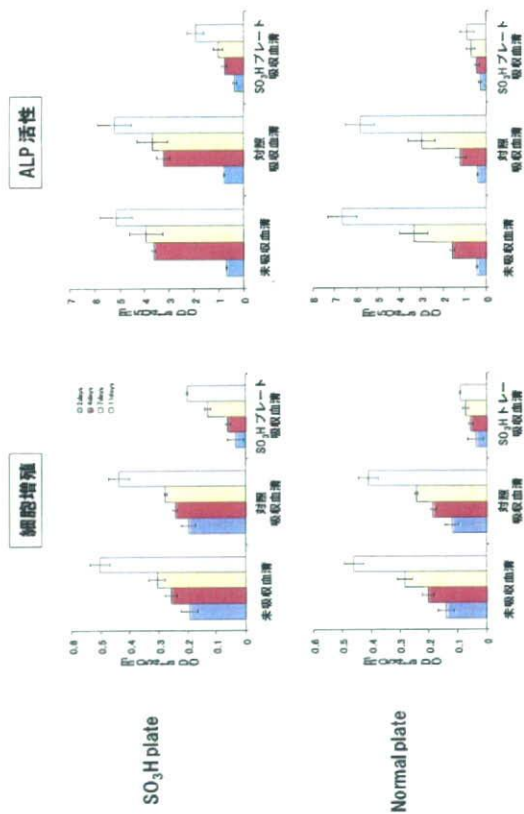


Fig 1. 吸収血清を使用した NHOst の培養実験結果.

Table 1. LC-MS/MS 解析による血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の同定結果

血清蛋白質				スルホン化プレート吸着蛋白質				
Code	Score	Sequence coverage	Code	Score	Sequence coverage	Code	Score	Sequence coverage
ALBU	1333	65	ALBU	881	53	BPT2	86	13
TRFE	491	25	CO3	702	13	HABP2	86	8
A1AT	472	33	FETA	562	34	VTD8	86	2
FETUA	316	32	HBBF	482	82	BLVRR	84	10
FETA	280	21	APOH	458	42	ENOA	84	9
VTDB	186	13	IPSP	348	28	IBP2	82	7
HBBF	172	21	TSP1	368	12	FA9	80	6
TTHY	146	24	PEDF	385	36	PLMN	77	4
APOA1	139	22	GFAH	268	10	CO4	76	3
ENDP1	118	5	APOA1	262	53	FETUA	75	9
FETUB	112	7	THRR	257	13	PROX6	75	7
A1AG	111	17	COMP	189	12	B2MG	57	31
A2MG	110	14	RETBP	168	20	ANT3	53	6
HBA	84	10	TETN	233	42	FBFA	51	7
AMBP	70	8	A1AT	232	14	CO9	50	2
ANT3	58	6	APOE	180	18	GO1A2	50	1
RETBP	53	10	HBA	178	53	FINC	39	1
APOH	45	4	AMBP	147	11	SCR1G	39	11
SYCF3	42	8	TAGL2	102	15	GPX3	38	5
BRD2	42	1	CO14	99	4	QB02	38	9
			PPIA	93	10	IOF2	37	5

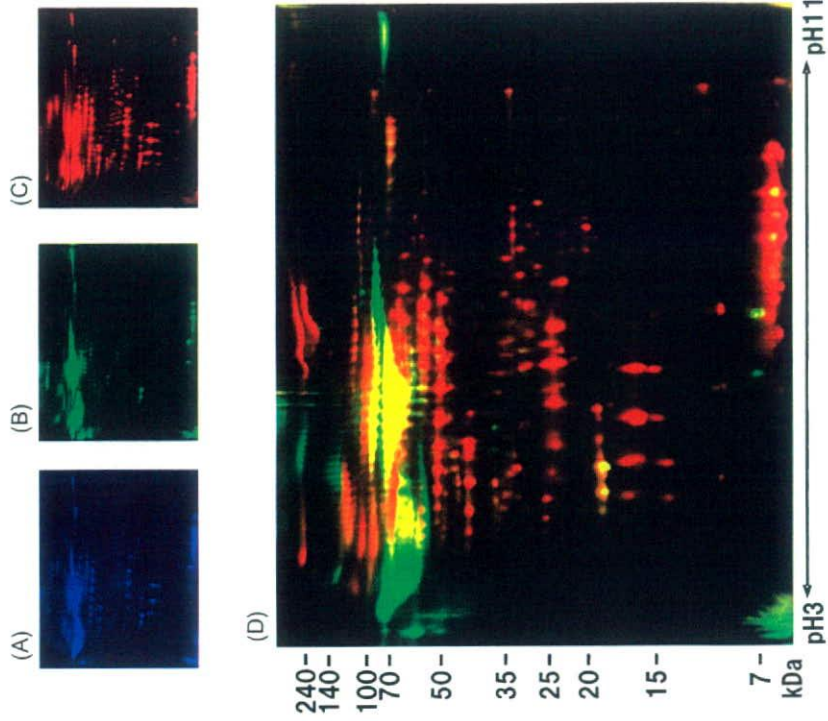


Fig 2. 血清蛋白質及びスルホン化プレート吸着蛋白質の二次元電気泳動. (A) 内部標準 (Cye2), (B) 血清蛋白質 (Cye3), (C) スルホン化プレート吸着蛋白質 (Cye5), (D) B+C.