

201034053A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の
新規評価方法の開発に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡厚子

平成 23 (2011) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

| | |
|--|---|
| 材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 松岡 厚子 | 1 |
|--|---|

II. 分担研究報告

| | |
|--|-----|
| 1. プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究 藪島 由二 | 11 |
| 2. 自己組織化膜を利用したモデル表面材料調製と細胞機能を利用した細胞挙動解析 中岡 竜介 | 37 |
| 3. アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析 伊佐間和郎 | 47 |
| 4. 遺伝子発現の網羅的解析を利用した医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験 澤田 留美 | 59 |
| 5. 生体適合性材料の機能と生物学的特性評価に関する検証試験 加藤 玲子 | 75 |
| 6. 整形インプラント材料の界面特性に着目した新規評価方法の開発 迫田 秀行 | 83 |
| 7. 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討 植松 美幸 | 95 |
| 8. 表面処理を行った整形インプラント材料の潤滑状態の検討 石川 格 | 105 |
| 9. 材料表面近傍の水和状態とタンパク質吸着挙動解析 石原 一彦 | 119 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| 10. 生体適合性高分子の合成と水の構造解析 田中 賢 | 129 |
| 11. 医療機器の分類に関する研究 横井 英人 | 133 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 139 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷り | |

I. 總 括 研 究 報 告

総括研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

研究代表者 松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部長

研究要旨

1. 実験研究の部

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。本研究では、材料表面と細胞の界面で観察される事象と、それらの相互反応の結果、細胞で観察される事象との比較を行い、従来法より迅速、高感度に医用材料の生体適合性を評価できる新規手法の探索を目的とする。

今年度は、材料としてはチタン、自己組織化膜、超高分子量ポリエチレン、ポリマーブラシを用いた。界面で観察される事象としては、水和状態、イオン吸着、アパタイト形成、タンパク質吸着及び摩擦係数を、細胞で観察される事象としては、遺伝子発現及びタンパク質発現を対象とした。その結果、チタン上で培養したヒト間葉系幹細胞では、骨分化傾向を示す遺伝子発現の変化が観察された。また、アルカリ処理したチタンでは、早期リン酸イオンの吸着に起因すると考えられる高いアパタイト形成能が観察され、同時に骨結合性に関与すると考えられるタンパク質群の結合と相関している傾向が認められた。また、材料近傍の水分子の状態について、アルコキシアルキル基を有する（メタ）アクリレートを用いて、低温結晶形成として観測される中間水の構造が材料の生体適合性と関連している可能性が示唆され、カチオン型ポリマーブラシの表面では水分子の運動が抑制されタンパク質との相互作用が大きく、一方、双性イオン型ポリマーブラシではタンパク質との相互作用がほとんどないことが判明した。さらに、分子動力的シミュレーションにより、材料近傍の水分子の動きを可視化できることが示唆される計算結果が得られた。

2. 行政研究の部

国際的に使用されている医療機器の分類命名法である Global Medical Device Nomenclature (GMDN) の現状について、イタリア及びオーストラリアの規制当局での利用方法を調査した。その結果、各国の個別性に立脚した運用が抱える問題が認められた。また、平成 15 年 2 月 13 日付け医薬審発第 0213001 号厚生労働省医薬局審査管理課長通知「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」及び平成 15 年 3 月 19 日付け事務連絡医療機器審査 No. 36 厚生労働省医薬局審査管理課「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料」の改正作業を開始し、改正案の原案作成までを完了した。

| | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|---------|---|
| 研究分担者 | | 金澤由基子 | 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 |
| 薮島 由二 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長 | 佐藤 秀隆 | 財団法人 日本食品分析センター 総合企画部 |
| 中岡 竜介 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長 | 坂口 圭介 | テルモ株式会社 研究開発本部 |
| 伊佐間 和郎 | 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長 | 谷川 隆洋 | テルモ株式会社 研究開発本部 |
| 澤田 留美 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長 | 安江 靖子 | 株式会社メニコン 研究企画管理部 |
| 加藤 玲子 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官 | 藤井 道子 | 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 |
| 迫田 秀行 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官 | 尾崎 正康 | キヤノン株式会社 品質本部 |
| 植松 美幸 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 研究員 | 勝田 真一 | 財団法人 日本食品分析センター 千歳研究所 |
| 石川 格 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 研究員 | 畔上 二郎 | 財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 |
| 石原 一彦 | 東京大学大学院工学系研究科 教授 | 高島 宏昌 | 財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 |
| 田中 賢 | 山形大学大学院理工学研究科 教授 | 酒井 良忠 | 東レ・メディカル株式会社 オブザーバー |
| 横井 英人 | 香川大学医学部附属病院 医療情報部 教授 | 高橋 未明 | 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室 |
| 研究協力者 | | 牧村 知美 | 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室 |
| 井上 祐貴 | 東京大学大学院工学系研究科 助教 | | |
| 河上 強志 | 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究員 | A. 研究目的 | |
| 長谷川千恵 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 | | 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、図1に示すように、材料表面に水 |
| 中崎 知道 | 日本医療機器産業連合会 | | |
| 医療機器の生物学的安全性試験法検討会 研究協力者 | | | |
| 山影 康次 | 財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 | | |

やイオンが速やかに吸着し、次いで生体タンパク質の吸着が起こる。すなわち、医用材料と細胞は吸着タンパク質層を介して相互作用するため、同タンパク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。また、初期のイオン吸着動態はタンパク質吸着のほか、アパタイト形成にも影響すると共に、材料表面の水和状態は血液適合性（抗血栓性）の要因であるタンパク質吸着能や細胞接着能のほか、人工関節の耐摩耗性にも深く関与することが示唆されている。そこで、本研究ではバイオインターフェースの主要因子である材料表面の水和状態、初期イオン吸着及びタンパク質吸着動態のほか、材料上で培養した細胞の遺伝子及びタンパク質発現挙動等を指標として、医用材料の生体適合性を評価する新たな方法を確立することを目指す。

材料としては、チタン系金属、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）を初めとした種々の合成高分子及び表面官能基のみが異なる自己組織化膜（SAM）を使用する。初年度は各種材料の合成及び指標とする上記の各種因子を物理化学的手法により解析することを基本としたが、準備が整い次第、研究倫理委員会の規定を遵守しつつ、細胞挙動解析を含めた様々な生物学的試験や抜去インプラントの表面特性変化解析等を平行して実施することにより、各種指標と生物学的試験結果等の相関性を検証することとした。

バイオインターフェースの特性に着目した簡易スクリーニング法を医用材料の機能及び生体適合性評価に応用することは初めての試みである。本研究の目標が達成されることにより、埋植医療機器医用材料の安全性を予測することが可能となると考えられる。

また、新規材料の開発を迅速化できると共に、動物を使用した埋植試験を減らすことができる可能性もあることから、本研究の成果は医療機器の開発及び厚生行政に大きく貢献することが期待される。

B. 研究方法

1. 研究方法は各分担研究報告書を参照のこと。

2. 倫理面への配慮

本研究でヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いているが、市販品であり倫理的問題はないと思われる。

C. 研究結果

1. 実験研究の部

詳細は各分担研究報告書に記載のとおりであるが、ここでは本研究での各分担研究者の研究を材料、細胞及び観察指標の観点から概観する（表1）。分担研究は、その観察指標を大きく、材料表面と細胞の界面で観察される事象と、それらの相互反応の結果、細胞で観察される事象との二つに分けられる。

界面観察研究では、アルコキシアルキル基を有する（メタ）アクリレートを用いて、低温結晶形成として観測される中間水の構造が、材料の生体適合性と関連している可能性が示唆された（研究分担者 田中）。また、カチオン型ポリマーブラシの表面では水分子の運動が抑制されタンパク質との相互作用が大きく（タンパク質との結合が強い）、一方、双性イオン型ポリマーブラシではタンパク質との相互作用がほとんどないことが判明した（石原）。金属表面での研究ではアルカリ処理によりカルシウムを導入したチタンを用いて、チタンのアパタイト形成能は早期のリン酸イオンの吸着に起因している

ことが示唆され（伊佐間）、アパタイト形成能と骨結合性に関与すると考えられるタンパク質群の結合とは相関している傾向が認められた（鮎島）。また、材料表面の水和状態と人工関節の耐摩耗性との関連を確認するための装置として、既存の摩擦試験機に改造を加えた摩擦係数測定システムを構築し、超高分子量ポリエチレンを用いてシステムの妥当性を確認できた（迫田）。加えて、ポリマーブラシを付与した人工関節材料界面における潤滑状態をシミュレーションするためのプログラムの開発も開始した（石川）。さらに、分子動学的シミュレーションをベースに材料近傍の水の結合状態を可視化することを試みた。その結果、11種類の高分子材料の1ユニット分及び10ユニット分について、拡散係数を導入することで、その周りの水分子の動きを観察することができた（植松）。

一方、細胞で観察される事象の研究では、チタン上で培養したヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）の遺伝子発現を、通常の培養ディッシュで培養した細胞のそれと比較すると、細胞周期停止及び骨芽細胞分化や破骨細胞分化に関連する遺伝子発現が上昇し、hMSCの骨への分化を促進する傾向が認められた（澤田）。同じ条件で、タンパク質発現に関するデータも取得し、現在解析中である（加藤）。また、各種SAMをモデル材料として実施した代謝共同阻害試験（細胞間連絡機能を評価する試験）の結果、細胞播種翌日の細胞専有面積と材料の接触角との間には相関傾向が認められたが、細胞毒性又は細胞間連絡機能と接触角との間には、相関性は認められなかった（中岡）。

2. 行政研究の部

イタリアは独自の医療機器のコードを開発し、GMDNとのリンクを準備した。オーストラリアは、2002年時点でのGMDNを利用して、規制用のコードとし、以後必要に応じて、オーストラリアのコード体系との整合性を確認した上でGMDNのコード追加に対応している。また、本邦の規制に於ける有用な使用方法を検討する上で、他の研究にて行われている、医療機器の不具合用語集の開発過程に於いてJMDNの使用方法を調査した。集計・分類に用いて、その安全対策上の妥当性を認識したがGMDNの持つ資産を全て使ったというわけではなかった（横井）。

平成17年の薬事法改正をはじめとする国内関連規制の改正及び準拠している国際基準ISO 10993シリーズの改正に伴い、平成15年2月13日付け医薬審発第0213001号厚生労働省医薬局審査管理課長通知「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」及び平成15年3月19日付け事務連絡医療機器審査No.36厚生労働省医薬局審査管理課「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料」についても、改正の必要が生じた。そこで、以下の4回の会議を国立医薬品食品衛生研究所で開催し、改正案の原案の作成までを完了した（松岡）。

第1回：2010年7月27日（火）

午後1時～3時

第2回：2010年9月28日（火）

午後1時～5時

第3回：2010年11月26日（金）

午後1時～5時

第4回：2011年2月1日（火）

午後1時～5時30分

D. 考察

埋植医療機器で報告される不具合は、材料との接触により細胞や周囲組織が引き起こす生体反応に起因することが多い。その不具合の原因を検討するためには、材料の表面特性やバルク的特性、材料・細胞間の相互作用を詳細に解析することが必要となる。また、現在では、生体に適用する医療機器の安全性評価に必要な非臨床試験の重要度も増してきている。そこで、本研究では材料表面の水和状態、初期イオン吸着及びタンパク質吸着挙動等、バイオインターフェースを支配する主要因子のほか、材料上で培養した細胞の遺伝子及びタンパク質発現挙動等を詳細に検討した後、医用材料が示す生物学的特性との相関性を総合的に検証することにより、これらの因子を指標として医用材料の生体適合性を *in vitro* で評価する簡易スクリーニング法を開発することをめざしている。

今年度の研究で、シミュレーションにより、材料の周りの水の動きを観察することができた。まだ、計算上でのみの結果であるが、今後、他の同じ目的の実験を実施しているグループのデータと比較することにより改良を加え、シミュレーションを用いて、実験で観察される事象を表すことができることが期待される。

チタン上で培養した hMSC の遺伝子発現解析の結果から、特に骨への分化誘導因子を培養系に添加していないにもかかわらず、hMSC の骨分化を促進する傾向が認められた。界面観察研究において、未処理のチタンでのアパタイト形成能は、アルカリ処理のそれとくらべれば低い。来年度は、アルカリ処理チタン上で培養した hMSC の遺伝子発現及びタンパク質発現解析を行い、アパタイト形成能及びタンパク質吸着能と遺伝子発

現並びにタンパク質発現との比較を行う予定である。

研究初年度では、各研究分担者がもっている特色のある材料、手法等を使った研究報告がなされた。来年度からは、報告された材料をその他の研究者にもその研究者の手法で測定してもらい、材料と観察指標からなるマトリックスを埋めるようにデータを取得し、全体で比較ができるようにしていきたいと考えている。例えば、MPC ポリマー加工を施した UHMWPE の摩擦係数が、未処理のものと比較してどのように変化するか。その変化を潤滑状態シミュレーションで表せるか、また、その変化と生体適合性との関連等である。材料表面構造、材料表面での水和状態、タンパク質吸着、細胞、遺伝子発現、タンパク質発現等の間に非常に興味深い知見が得られるものと期待される。

E. 結論

チタン、自己組織化膜、超高分子量ポリエチレン、ポリマーブラシを材料とし、界面で観察される事象としては、水和状態、イオン吸着、アパタイト形成、タンパク質吸着及び摩擦係数を、細胞で観察される事象としては、遺伝子発現及びタンパク質発現を対象とした。その結果、チタン上で培養したヒト間葉系幹細胞では、骨分化傾向を示す遺伝子発現の変化が観察された。また、アルカリ処理したチタンでは、早期リン酸イオンの吸着に起因すると考えられる高いアパタイト形成能が観察され、同時に骨結合性に関与すると考えられるタンパク質群の結合と相関している傾向が認められた。また、材料近傍の水分子の状態について、アルコキシアルキル基を有する(メタ)アクリレートを用いて、低温結晶形成として観測される中間水の構造が、

材料の生体適合性と関連している可能性が示唆され、カチオン型ポリマーブラシの表面では水分子の運動が抑制されタンパク質との相互作用が大きく、一方、双性イオン型ポリマーブラシではタンパク質との相互作用がほとんどないことが判明した。さらに、分子動力的シミュレーションにより、材料近傍の水分子の動きを可視化できることが示唆される計算結果が得られた。

行政研究として、GMDN の現状についてイタリア及びオーストラリアの規制当局での利用方法を調査し、また、現行の医療機器の生物学的安全性試験法の改正作業を開始し、原案の作成までを完了した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 澤田留美、山田貴史、土屋利江、松岡厚子

ヒト間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析—無血清培地を用いた *in vitro* 培養期間中の遺伝子発現の変化について—

YAKUGAKU ZASSHI 130, 1387-1393 (2010)

2) 迫田秀行、石川格、脇谷滋之、天正恵治、佐藤道夫、松岡厚子

人工関節用超高分子量ポリエチレンのフラクトグラフィに関する基礎的研究

臨床バイオメカニクス 31, 187-191 (2010)

3) 石川 格、迫田 秀行、菅野 信彦、松岡 厚子、土屋 利江

光学式 3D デジタイザによる抜去人工股関節 UHMWPE ライナーの摩耗測定

臨床バイオメカニクス, 31, 299-304 (2010)

4) 迫田秀行、石川格、松岡厚子、西井孝、菅野伸彦

破損したバイポーラ型人工骨頭の不具合要因分析

日本人工関節学会誌 40, 550-551 (2010)

5) Matsuoka, A., Y. Matsuda, Kaniwa M.

Needle fibers of an azo-dye mixture induce polyploidy in a Chinese hamster cell line

CHL. Bull. Natl. Inst. Health Sci., 128, 65-70 (2010)

6) 松岡厚子

In vitro 培養ヒト間葉系幹細胞の細胞遺伝学的安全性評価法に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所報告 128, 50-57 (2010)

2. 学会発表

1) Matsuoka A., Matsuda Y., Isama K., Sakoda H.: Polyploidy induction of polystyrene particles with specific diameters in a Chinese hamster cell line

Nanootheranostics-Fabrication & Safety Concerns (2010.4 キプロスアギヤナバ)

2) 伊佐間和郎、児玉幸夫、吉田緑、中嶋富士雄、西川秋佳、松岡厚子：家庭用品に用いられるコロイダルシリカ及び銀ナノ粒子の安全性評価

第 37 回日本トキシコロジー学会 (2010.6 沖縄)

3) Matsuoka A., Kodama Y., Yoshida M., Isama K., Nakajima F., Inoue K., Kawakami T., Nishikawa A.

Safety evaluation of nanomaterials used in household products

XII International Congress of Toxicology

- (2010.7 バルセロナ)
- 4) 松岡厚子：医療機器の生物学的安全性試験を取り巻く現状
日本生体医工学会医療機器レギュラトリーサイエンス専門別研究会第1回研究会
(2010.7 東京)
- 5) 伊佐間和郎、河上強志、土屋利江、松岡厚子：カルシウム導入したチタン合金等のアパタイト形成能と細胞毒性
日本金属学会 2010 年秋期大会 (2010.9 札幌)
- 6) 迫田秀行、松岡厚子：高度架橋超高分子量ポリエチレンの疲労特性評価
日本機械学会 2010 年度年次大会 (2010.9 名古屋)
- 7) 松岡厚子：不溶性粒子の粒子径依存的細胞毒性発現
第 83 回人工関節の機能高度化研究会 (2010.9 岡山)
- 8) Isama K., Kawakami T., Tsuchiya T., Matsuoka A.
Apatite-Forming Ability of Calcium-Incorporated Ti-Zr-Nb Alloys
23rd European Conference on Biomaterials (2010.9 Tampere, Finland)
- 9) 迫田秀行、石川格、松岡厚子：次世代医療機器評価指標作成事業における整形インプラントの力学的安全性の考え方
第 37 回日本臨床バイオメカニクス学会 (2010.11 京都)
- 10) 迫田秀行、松岡厚子：打ち抜き試験による超高分子量ポリエチレンの機械特性評価
第 37 回日本臨床バイオメカニクス学会 (2010.11 京都)
- 11) 澤田留美、手嶋英樹、庄嶋賢弘、高木数実、田山栄基、福永周司、青柳成明、土屋利江、松岡厚子：人工心臓弁の機能不全発症に関わる遺伝子多型の探索のための SNP 解析
第 48 回日本人工臓器学会大会 (2010.11 仙台)
- 12) 薮島由二、長谷川千恵、伊佐間和郎、松岡厚子：表面処理を施したチタンプレートに吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析
第 32 回日本バイオマテリアル学会 (2010.11 広島)
- 13) 中岡竜介、松岡厚子：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 (3)：種々の官能基組成による細胞機能への影響
第 32 回日本バイオマテリアル学会 (2010.11 広島)
- 14) 迫田秀行、薮島由二、松岡厚子：生体脂質による超高分子量ポリエチレンの酸化劣化
第 32 回日本バイオマテリアル学会 (2010.11 広島)
- 15) 伊佐間和郎、河上強志、土屋利江、松岡厚子：カルシウム導入した Ti-Zr-Nb 合金の骨芽細胞適合性
第 32 回日本バイオマテリアル学会 (2010.11 広島)
- 16) 伊佐間和郎、河上強志、児玉幸夫、中嶋富士雄、吉田緑、井上薫、西川秋佳、松岡厚子：家庭用品に使用される酸化亜鉛ナノ粒子の安全性評価
第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11 神戸)
- 17) 迫田秀行、松岡厚子：超高分子量ポリエチレンのデラミネーション破壊発生特性評価法の開発
第 23 回バイオエンジニアリング講演会

- (2011.1 熊本)
- 18) 石川格、迫田秀行、藤原邦彦、杉本智広、蔵本孝一、土居憲司、松岡厚子：股関節シミュレータ摩耗試験後の UHMWPE ライナーを用いた新規ライナー摩耗量算出法の検証
第 41 回日本人工関節学会 (2011.2 東京)
- 19) 松岡厚子、児玉幸夫、吉田緑、井佐間和郎、中嶋富士雄、井上薫、河上強志、西川秋佳：家庭用品で使用されるナノ材料の安全性評価
第 39 回日本環境変異原学会 (2010.11 つくば)
- 20) 松岡厚子、宮島敦子、加藤玲子、酒井恵子、高久彩子、谷口彰良：各種細胞毒性試験のナノ粒子に対する感受性の比較
第 39 回日本環境変異原学会 (2010.11 つくば)
- 21) Sakoda H., Kawakami T., Haishima Y., Tensho K., Wakitani S., Masuoka A.: Quantitative analysis of lipids extracted from retrieved UHMWPE knee component by organic solvents
Orthopaedic Research Society, 57th Annual Meeting (2011.1 ロングビーチ、アメリカ)
- 22) 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子：次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療審査 WG の活動報告
第 10 回日本再生医療学会 (2011.3 東京)
- 23) 齋島由二、長谷川千恵、澤田留美、松岡厚子：間葉系幹細胞の増殖・分化能に及ぼすエンドトキシシンの影響評価
第 10 回日本再生医療学会 (2011.3 東京)
- 24) 澤田留美、土屋利江、松岡厚子：細胞組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価—細胞の凍結保存による遺伝子発現への影響—

- 第 10 回日本再生医療学会 (2011.3 東京)
- 25) Kato R., Sato M., Kokubo M., Mochida J., Matsuoka A.: The effects of cultured chondrocytes on immune reaction in vitro
The 24th Annual meeting of Japanese Society of Cartilage Metabolism (2011.3 福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

I. 後記

本研究報告書を取り纏め中の、平成 23 年 3 月 11 日に東北関東大震災が発生した。地震、津波、その後の福島県原子力発電所の被害により日本全体が重苦しい空気に包まれている。亡くなられた方へ哀悼の意を表すとともに、近い将来の復興を祈念する。

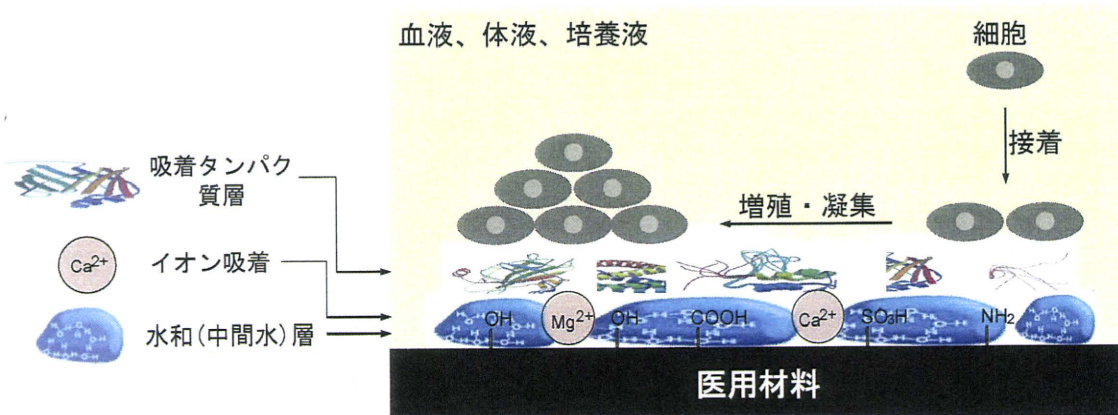


図1 材料／細胞界面の模式図

表1 分担研究で使用した材料、細胞及び観察指標の一覧

| 分担研究者 | 材料 | 細胞又は擬似体液等 | 観察指標 |
|-------|------------------|------------------|-----------------|
| 龍島 | チタン(アルカリ処理を含む) | HBSS, 培養液等 | アパタイト形成、タンパク質吸着 |
| 中岡 | 自己組織化膜 | V79 | 細胞間連絡機能、接触角 |
| 伊佐間 | チタン(アルカリ処理を含む) | 擬似体液 | イオン吸着 |
| 澤田 | チタン | hMSC | 遺伝子発現 |
| 加藤 | チタン | hMSC | タンパク質発現 |
| 迫田 | UHMWPE、コバルトクロム合金 | 潤滑液(牛血清水溶液) | 摩擦係数 |
| 植松 | ポリマー(仮想) | 水(仮想) | 水和状態(仮想) |
| 石川 | ポリマーブラシ(仮想) | 関節液(仮想) | 潤滑状態(仮想) |
| 石原 | ポリマーブラシ表面 | 水、タンパク質固定化カンチレバー | 水和状態、タンパク質吸着 |
| 田中 | (メタ)アクリレート類 | 水 | 中間水(低温結晶形成) |

hMSC: ヒト間葉系幹細胞、UHMWPE: 超高分子量ポリエチレン

II. 分 担 研 究 報 告

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

分担研究課題名

プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究

| | | | |
|-------|-------|--------------|-------|
| 研究代表者 | 松岡 厚子 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 医療機器部 |
| 研究分担者 | 靄島 由二 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 医療機器部 |
| 研究協力者 | 伊佐間和郎 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 医療機器部 |
| | 長谷川千恵 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 医療機器部 |

研究要旨

本研究では、チタンの生体適合性を蛋白質吸着特性から評価することを目的として、幾つかの化学処理を施したチタン表面に吸着する血清蛋白質の網羅的プロテオミクス解析を行い、ハイドロキシアパタイト (HAp) 形成能と比較検討した。

チタンプレート表面における HAp 形成能を評価した結果、1 週間浸漬の場合、未処理のプレートには HAp 形成が認められなかった。一方、化学処理を施したプレートはいずれも HAp 形成能を有していたが、その形成速度に差異が認められた。チタンプレート表面への血清蛋白質の吸着挙動を解析した結果、未処理プレートに比較して、化学処理プレート上には骨結合性に深く関与すると思われる蛋白質群 (骨系蛋白質、成長因子関連蛋白質、ホルモン、細胞外マトリクス等) が有意に結合することが明らかになった。また、これらの蛋白質の吸着挙動は化学処理の違いにより変動することも確認されたことから、チタン材料の骨親和性は蛋白質の吸着パターンから予測可能であることが示唆された。今後、他の研究において得られた知見と合わせ、骨親和性を担う機能性蛋白質の同定を試みると共に、候補蛋白質の吸着量を正確に解析するため、MRM 分析を利用した標的プロテオミクス解析を行う予定である。

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、次いで生体蛋白質の吸着

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

医用材料の蛋白質吸着については、血栓形成や細胞接着等に着目した研究が行われてきたが、材料に吸着する蛋白質の種類を網羅的に解析し、その吸着パターンから材料の機能や生体適合性を評価する

研究は現在までに実施されていない。材料表面への蛋白質吸着挙動から細胞や組織に対する影響を評価する手法は材料プロテオームと呼ぶべき新しい分野のプロテオミクスとなる。プロテオミクスの技術は培養細胞や埋植材料周辺域における組織の性状変化の解析等にも利用できる。網羅的解析により特定のバイオマーカ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。

近年、我々はヒト正常骨芽細胞 (NH0st) に対する分化促進機能を示すスルホン化プレートモデル材料として、医用材料の機能評価や生体適合性評価におけるプロテオミクス解析の有用性について検討してきた。その結果、スルホン化プレート表面には骨形成に関与する蛋白質群が有意に吸着することが判明した。また、同プレート上で培養した NH0st の遺伝子及び蛋白質発現挙動を検討した結果、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。このように、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新しい手法として非常に有益であることが確認できたため、今後、種々の医用材料に適用して行く予定である。

チタンは他の金属材料と比較して骨親和性に優れていることから、生体硬組織代替材料として広く使用されている。現在までに、チタンの生体適合性を向上させるため、様々な表面修飾と HAp 形成能との相関性が検討されている。一方、チタンは HAp のほか、オステオポンチン等

の骨性蛋白質を吸着する作用を持つことが示唆されているが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、チタンの生体適合性を蛋白質吸着特性から評価することを目的として、幾つかの化学処理を施したチタン表面に吸着する血清蛋白質の網羅的プロテオミクス解析を行い、HAp 形成能と比較検討した。

B. 研究方法

(1) チタンプレートの化学処理

ニラコ社製純チタンプレート (10 x 10 cm, 0.3 mm 厚) を #600、#800 及び #1200 の耐水性紙ヤスリで順次研磨した後、以下に記載した方法により表面の化学処理を行った (未処理 No. 1, 化学処理 No. 2-6)。焼成には丸祥電器社製 SPM100-17V を使用した。

| 番号 | 化学処理 |
|----|---|
| 1 | 未処理 |
| 2 | 5M NaOH, 60°C, 24 hr |
| 3 | (1) 5M NaOH, 60°C, 24 hr (2) 0.1M HCl, 40°C, 24 hr (3) 600°C, 1 hr (昇温 5°C/min) |
| 4 | (1) 5M NaOH, 60°C, 24 hr (2) 0.1M CaCl ₂ , 40°C, 24 hr (3) 600°C, 1 hr (昇温 5°C/min) (4) H ₂ O, 80°C, 24 hr |
| 5 | (1) 3% H ₂ O ₂ , 80°C, 3 hr (2) 400°C, 1 hr (昇温 5°C/min) |
| 6 | (1) 3% H ₂ O ₂ /50mM HNO ₃ , 80°C, 20 min (2) 10mM Ca(OH) ₂ , Autoclave, 12 hr |

(2) HAp 形成実験

2-1. 浸漬条件

各プレートを 5 x 5 mm 片に裁断し、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS: CaCl₂+, MgCl₂+)、10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 α MEM 培地及び FBS に 37°C で種々の時間浸漬させた。材料/溶媒量比は 10 ml/cm² とし、2 日間毎に溶媒を交換した。浸漬終了後、脱イオン水及びアセトンに

より順次穏やかに洗浄し、乾燥させた。

2-2. 表面解析

表面構造は、5 x 5 mm 程度に裁断した試料片を JEOL Quick Auto Coater JFC-1500 により Au 被覆した後、JEOL JSM-5800LV 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて倍率 5,000 倍で観察した。表面元素組成は島津製作所製 ESCA-3200 を用いた XPS 解析により検討した¹⁾。

(3) 血清蛋白質の吸着と回収

各プレート (10 x 10 cm) を入れた 15 φ cm ガラス製シャーレに 50 ml のヒト血清 (Lonza) を添加し、室温下、4 時間緩やかに振とうした後、同血清を除去した。次いで、同プレートを氷冷した 1 mM PBS により 5 回洗浄した後、20 ml の Sigma-Aldrich 社製 Chaotropic Membrane Extraction Reagent 2 (Reagent 2) を添加し、室温で 60 分間、緩やかに振とうした。同溶液を Corning 社製 Spin-X UF (Cut Off = 5 kDa) により濃縮し、冷メタノール沈殿法により蛋白質画分を回収し、Reagent 3 に再溶解した後、GE 社製 2DQuant により蛋白質量を測定した。得られた蛋白質は試験に供するまで凍結保存した。

(4) ペプチド試料の調製

常法に従って還元 (TBP) 及びアルキル化 (ヨードアセトアミド) した蛋白質試料 (50 μg) を含む Reagent 3 溶液 8 μl に 50 mM NH₄HCO₃ (87.2 μl)、プロメガ社製 ProteaseMax Surfactant (1%, 3 μl) 及び Trypsin Gold (1 μg/ml, 1.8 μl) 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 μl を加え、室温で

5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドはバリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 μl) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、0.1 μg/μl の濃度になるように 0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析に供するまで 4°C で保存した。

(5) LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、Thermo Scientific 社製 リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ/Orbitrap XL を使用し、測定前に Tyrosine-1, 3, 6-Standard (CS Bio Co.) を用いてチューニング及び質量校正を行った。Nano-LC としては、DiNa-A オートサンプラー (KYA Tech) を装備した DiNa システム (KYA Tech) を使用した。トラップカートリッジ及び分析用逆相カラムとしては、それぞれ CERI 社製 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm)、KYA 社製 HiQ sil C18W-3 (0.1 x 100 mm) を使用した。スプレーチップとしては、KYA 社製 TI-30-150 チップを使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.8 kV) により行った。スキャンデータ (MS スペクトル) は FT analyzer (分解能 30,000, 測定質量範囲 m/z 350-1,400, Lock mass = シロキサン, Profile mode) により取得し、XCalibur data dependent mode により、各スキャンにおけるイオン強度の高い 3 種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。

測定時間はサンプル注入 10 分後から 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1%ギ酸含有 2%アセトニトリル) と B 溶媒 (0.1%ギ酸含有 90%アセトニトリル) を使用した。流速は 300 nl/min とし、サンプル注入 (0.5 µg) はオートサンプラーを使用して行った。一分析当たりの溶出時間は 160 分とし、サンプル注入後、脱塩ステップとして 10 分間は A 溶媒のみを送液した後、120 分かけて B 溶媒濃度を 50%まで上昇させた。その後、5 分間かけて B 溶媒濃度を 100%まで増加させ、10 分間保持後、15 分間 A 溶媒のみを送液して流路を平衡化した。また、次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。測定の繰り返し数は n=3 とした。

分析終了後、得られた MS データに基づいて作成した Reject Mass List (後述) を Method File に登録し、同様の分析を更に 2 回繰り返すことにより、MS/MS データを取得するペプチド数を増加させた。

(6) 蛋白質の同定と定量

6-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データを Thermo Scientific 社製蛋白質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェアにアップロードし、Mascot 検索 Work Flow/UniPort/Swiss-Prot データベースを利用して蛋白質同定を行った後、同定された全てのペプチドサーチ結果を Reject Mass List に指定した。リテンションタイムトレランスは ±3-5 分に設定した。

6-2. 比較定量解析

非標識条件下における蛋白質の多変量解析はメディカルプロテオスコープ社製 i-RUBY ソフトウェアを用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群 (各試料 n=3x3) を同ソフトウェアにインストールした後、Mascot/UniPort/Swiss-Prot データベースによる蛋白質同定、アルブミン由来ペプチドを利用したリテンションタイム補正、MS/MS スペクトル相同性に基づいたピークマッチングを行うことにより、蛋白質の比較定量解析を行った。

C. 研究結果

(1) HAp 形成能の評価

HBSS に浸漬させた各チタンプレートの SEM 画像を図 1 に示した。4 時間及び 2 日間浸漬では HAp 形成が認められなかったが、No. 2、No. 4-6 については浸漬後 1 週間で HAp 形成が起り、2 週間浸漬すると未処理プレート (No. 1) を含めた全プレート上に HAp が形成された。HAp 形成速度は No. 2>No. 4, 5>No. 6>No. 3, 1 の順であった。

HBSS 浸漬前後の各プレートの XPS 解析結果を図 2-5 に示した。浸漬前の各プレートからは共通して O1s、C1s、Ti2p1 及び Ti2p3 のシグナルが検出されたほか、化学処理時に CaCl₂ 及び Ca(OH)₂ を使用した No. 4 と No. 6 からは微量の Ca2p、No. 2 には Na Auger のシグナルが観測された (図 2)。HBSS に 4 時間浸漬させると全てのプレートに微量の Ca2p シグナルが観測された (図 3)。2 日間浸漬後の XPS スペクトルは 4 時間浸漬時と同様であったが、図 4, 5 に示したように、1 週間及び 2 週間後では全てのプレートともに浸漬時間の

延長に伴って Ti シグナルが減少し、Ca2p、P2s、P2p シグナルが増加することが確認され、SEM 解析と相関する結果が得られた。

10% FBS 含有 α MEM 培地及び FBS に 4 時間浸漬すると全てのプレートから N1s シグナルが観測されたことから、各プレート表面への蛋白質吸着は速やかに起こることが確認された (図 6,7)。両溶媒に 2 週間浸漬した際の XPS スペクトルを図 8,9 に示した。HBSS 浸漬時と同様、全プレートともに浸漬時間の延長に伴い Ti シグナルは減少し、N1s、Ca2p、P2s、P2p シグナルは増強することが認められた。しかし、図 10 に示したように、10% FBS 含有 α MEM 培地及び FBS に 2 週間浸漬した各プレートの SEM 解析では典型的な HAp の粒状結晶が観察されなかったことから、両溶媒に浸漬した際に形成されるリン酸カルシウムは Octacalcium phosphate (OCP) であることが示唆された。

(2) チタンプレート吸着蛋白質の解析

各チタンプレートに吸着した蛋白質の回収量は 55.4 μ g (No.1)、478.3 μ g (No.2)、137.8 μ g (No.3)、585.2 μ g (No.4)、136.9 μ g (No.5) 及び 81.8 μ g (No.6) であった。等量の試料を LC-MS/MS ショットガン解析に供して得られた MS データ (n=3x3x6) を i-RUBY ソフトウェアにインストールしてデータベース検索した結果、2,604 (p<0.05) 個の蛋白質が同定された。これらの中から骨形成に関与すると思われる蛋白質群を抽出した後、i-RUBY により得られた多変量解析結果を各プレートから回収された蛋白質量に基づいて補正した対照 (No.1) に対する比較定量値を表 1-16 に示した。なお、対照プレートから検出されなかった蛋白質については実測値を

表記した。

多変量解析の結果、骨吸収に関与すると蛋白質群も若干検出されたが、対照と比較して化学処理したチタンプレートには骨形成に関与する蛋白質群が有意に吸着することが判明した。

2-1. 成長因子・サイトカイン類 (表 1)

化学処理プレートには、骨形成に深く関与することが知られている BMP2、FGF2、IGF1、IGF2 及び HGF (MST1) が有意に吸着した。この吸着は特に No.2 と No.4 プレートに顕著であった。IGF 関連蛋白質として IGFBP1-4 を初めとした種々の IGF Binding Protein も化学処理群に顕著に吸着することが判明した。その他、BMP 関連蛋白質である BMP2K、HGF 関連蛋白質である HGFAC、HGS、FETUB、FGF 関連蛋白質である SHISA2 も化学処理プレートに吸着することが認められた。

細胞分化に関与することが知られている TGF スーパーファミリー関連蛋白質としては、TGFB1 と GDF8 (MSTN) が同定された。サイトカイン関連蛋白質としては、破骨細胞の増殖と分化を抑制すると共に、 $\text{INF } \gamma$ を誘導する IL18RAP、インテグリン活性化能を持つ CXCR3、BMP4/Wnt シグナルを活性化する CXXC5 等が化学処理群に有意に吸着した。その他、IFN 関連蛋白質である INFB1、IRF7、INFG1、TNF 活性阻害能や NF- κ B 転写抑制能を持つ TNIP2、TTRAP、HIVEP3 (成人骨形成必須蛋白質)、NUMBL、TAX1BP1 が化学処理プレートに顕著に吸着した。また、成長因子関連蛋白質である GIGYF2、RGNEF、JUNB や細胞選択・形態形成に関与する細胞接着因子である種々のカドヘリンスーパーファミリー蛋白質が化学処理群から有意に検出さ

れた。

2-2. ホルモン・ステロイド類 (表 2)

化学処理プレートには、骨形成に関与することが知られているエストロゲンの受容体蛋白質 (ESR1) が有意に吸着することが確認された。この吸着は特に No. 2 と No. 4 で顕著であった。ステロイド受容体の転写活性を促進する ESR1 やステロイドコアクティベータである NCOA6 のほか、アンドロゲン受容体シグナルの伝達を増強し、NMDA 依存的 AMPA 受容体を制御する HIP1 も化学処理群に吸着することが判明した。

2-3. 骨系蛋白質 (表 3)

骨形成初期に関与する TETN (CLEC3B)、Leucine-rich Proteoglycan に分類されるオステオグリシン (Mimcan, OGN) と LUM、Ca/リン酸水溶性複合体として骨形成に関与する AHSG、軟骨細胞の増殖と分化に関与する CHAD のほか、PRG4 が化学処理プレートに有意に吸着することが確認された。TETN と OGN の吸着は No. 2 と No. 4、LUM、AHSG、CHAD の吸着は No. 4 に顕著であった。

2-4. グルタミン酸関連蛋白質 (表 4)

KMO を初めとしたグルタミン酸合成に関与する種々の因子のほか、GRM6、GRIA2、GRIN1、GRM7、GRIA3、GRIN3B が化学処理プレートに有意に吸着した。この吸着は特に No. 2 と No. 4 に顕著に認められた。

2-5. Ca チャンネル蛋白質 (表 5)

細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の調節に関与する IP3 受容体の活性化能を持つ STIM1 のほか、Ca チャンネルを形成する幾つかの

関連蛋白質が化学処理群に有意に吸着した。STIM1 の吸着は、No. 4 が顕著であり、No. 2、No. 3、No. 5 にも認められるが、No. 6 への吸着量は対照と同等であることが判明した。その他の関連蛋白質も No. 2-5 には吸着するが、No. 6 プレートへの吸着量は ATP2C1 を除き、対照と比較して大きく変動しないことが確認された。

2-6. ビタミン関連蛋白質 (表 6)

ビタミン D3 受容体 (VDR) のほか、ビタミン D、エストロゲン及び糖質コルチコイドのシグナル伝達に関連する SMARCE1 と SNW1、ビタミン D 関連蛋白質である GC、CYP2R1、ビタミン K 関連蛋白質である GGCC が化学処理プレートに有意に吸着した。各蛋白質の吸着は特に No. 2 と No. 4 で顕著であり、No. 6 プレートへの吸着は SMARCE1 を除き、対照と比較して大きく変動しないことが確認された。

2-7. 金属関連蛋白質 (表 7)

Fe 結合性蛋白質である TF、LTF、MF12、Cu 結合性蛋白質である COX17、CUTC、Mg 輸送に関与する ZDHHC13 が化学処理プレートに有意に吸着した。COX17 の吸着は特に No. 4 が顕著であった。その他の蛋白質も No. 2-5 には吸着するが、No. 6 への吸着は COX17 を除き、対照と比較して大きく変動しないことが確認された。CNNM4 と Zn 輸送に関与する SLC39A12 は対照プレート (No. 1) には吸着しなかった。SLC39A12 は No. 6 プレートからも検出されなかったが、No. 2 と No. 4 を中心として、その他の化学処理プレートには吸着することが確認された。

2-8. HOX 関連蛋白質 (表 8)