

201235049A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡厚子

平成 25 (2013) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究 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 齧島 由二	11
2. 医用材料の血液適合性を含む生体適合性における細胞応答に関する研究 宮島 敦子	39
3. 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	65
4. 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	81
5. 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	93
6. 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	117
7. 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	133
8. 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	151
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	169

10. 生体適合性高分子の合成と水の構造解析 175
田中 賢

11. 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 179
石川 格

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（書籍） 193

研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌） 194

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

I. 総括研究報告

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

「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

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

平成 22 年 12 月に日本発の植込み型補助人工心臓が、同時に 2 件製造販売承認取得に至った。これらを含む循環器系医療機器は、平成 13 年からの 10 年間に於いて、生産金額、出荷金額等いずれも他の機器より突出して高く、大量に使用されている。循環器系医療機器の基本的かつ重要な特性として、血液との接触がある。特に埋植する機器では、長期間にわたって血液凝固、血栓形成を起こさないことが要求される。これら血液適合性の評価法は、国際的にみても整備されているとは言いがたい。また、ヒト血液を用いない試験法の開発が望まれている。本研究では、上記の問題を克服し、医療機器開発を加速する規制環境整備の一環として、細胞と材料表面との界面特性に着目した新技術を用いる血液適合性評価手法の開発を目標とする。

今年度は、材料としてはチタン、PMPC 及び組成比の異なる PMEA/PHEMA 共重合体を、界面で観察される事象としては、水和状態、イオン吸着、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研究対象とした。その結果、金属材料チタンを使った研究では、アルカリ処理後、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ によるカルシウム導入は、材料表面にチタン酸カルシウムを形成することによって高いアパタイト形成能を発揮し、その上で培養したヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の遺伝子発現は、骨分化に関連する遺伝子の発現が亢進していた。一方、血液適合性が良い材料とされている PMEA については、シミュレーション及び実測でメトキシ基の酸素原子の回りに中間水の存在が示唆された。これまでに報告されている、中間水の存在と血液適合性との関係と一致した結果を得た。しかし、細胞及びタンパク質等が接着しにくいはずの PMEA 上で hMSC を培養すると、細胞は接着し、増殖した。

今後は、共通材料を PMEA/PHEMA 共重合体として、各指標間での比較も検討し、材料特性（血液適合性）との相関がよい指標を探索する。

【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
	医療機器部 室長		医療機器部 室長
宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所	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
 澤田 留美 国立医薬品食品衛生研究所
 医療機器部 室長
 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
 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
 植松 美幸 国立医薬品食品衛生研究所
 医療機器部 主任研究官
 石原 一彦 東京大学大学院工学系研究科
 教授
 石川 格 東洋大学計算力学
 研究センター 助手

【研究協力者】

田中 賢 山形大学大学院理工学研究科
 教授
 井上 祐貴 東京大学大学院工学系研究科
 助教
 棚橋 一裕 東レ先端材料研究所
 京本 政之 東京大学大学院工学系研究科
 産学連携研究員
 中野 達也 国立医薬品食品衛生研究所
 医薬安全科学部 室長
 瀬川 勝智 国立医薬品食品衛生研究所
 医薬安全科学部 主任研究官
 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所
 生活衛生化学部 主任研究官
 河野 健 国立医薬品食品衛生研究所
 医療機器部 研究員
 福井 千恵 国立医薬品食品衛生研究所
 医療機器部
 酒井 恵子 国立医薬品食品衛生研究所
 医療機器部
 比留間 瞳 国立医薬品食品衛生研究所
 医療機器部

【本文で使用される略号】

PCBMA: ポリカルボキシベタインメタクリレ
 ート
 PEEK: ポリエーテルエーテルケトン
 PHEMA: ポリ(2-ヒドロキシエチルメタアクリ
 レート)
 PMEAA: ポリ(2-メトキシエチルアクリレート)
 PMPC: ポリ(2-メタクリロイルオキシエチル
 ホスホリルコリン)
 PSF: ポリビニルピロリドン含有ポリスルホン

A. 研究目的

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に注目した。

従来、生体適合性は、細胞や実験動物を用いる試験、いわゆる生物学的安全性試験（細胞毒性試験、感作性試験、刺激性試験、血液適合性試験など）で評価を行っていたが、昨今の動物愛護、動物福祉の観点から使用する動物数の削減等が求められてきている。

一方、科学技術の発展、また科学的知見の蓄積から、以前には測定不可能であった、細胞と材料との界面に存在する各種要素の定性、定量的測定が可能となり、それらの要素の中には材料特性との関連が示唆されるものも報告されてきている。

そこで、本研究では、循環器系医療機器を対象に、上記バイオインターフェースの主要因子を、血液適合性評価に応用することを目的とする。

本年度は、材料は純チタン、PMEA/PHEMA共重合体を、新規評価指標候補として、材料表面近傍の水和状態、材料へのイオン及びタンパク質の吸着、並びに材料上で培養した細胞の遺伝子及びタンパク質発現解析について、検討する。材料表面近傍の水和状態は、DSC や NMR による実測と、コンピュータシミュレーションによる予測とを行う。

本研究の目標が達成されることにより、医用材料の血液適合性をより正確、迅速に予測することが可能となると考えられる。その成果をフィードバックすることにより、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

市販のヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて

いるが、倫理的には問題ないと考えられる。ヒト血液を用いる実験では、臨床研究に関する倫理指針に従って実施している。いずれも国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定に従っている。

C. 研究結果

詳細は各分担研究報告書に記載のとおりであるが、分担研究者の研究を材料、細胞及び観察指標の観点から整理すると表1のようになる。観察指標は大きく、材料表面と細胞と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、材料表面へのタンパク質吸着について、PSF、PMEA/PHEMA 及びこれまでに実施した対照材料6種からのデータを総合的に解析した結果、13種の血液適合性評価マーカを選定できた（靄島）。チタンへのアルカリ処理の条件を検討した結果、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理は、材料表面にチタン酸カルシウムを形成することによって高いアパタイト形成能を発揮することを見いだした（伊佐間）。界面を実際の医療機器、人工関節に応用し、ポリマー層の存在が摺動面での摩擦及び摩擦耗に及ぼす影響を実測及びシミュレーション予測の両面から検討している。実測では、人工関節摺動面のPMPCコーティングの摩擦測定を可能にし、摩擦係数0.001という超低摩擦が実現されていることを確認できた（迫田）。シミュレーションによる人工関節摺動面の摩擦状態推定では、解析手法である多重格子法について理論整理を行ったところである（石川）。一方、材料表面の水和状態に関連して、以下の結果を得た。PMEAをモデル材料にし、動径分布関数によるシミュレーションとNMRによる実測の両方から、メトキシ基の酸素原子のまわりに中間水の存在を示唆するデータを得た（植松）。さらに材料表

面の水和状態とタンパク質吸着挙動の関連について、活発に運動する水和層を有する材料表面では、タンパク質の水和層が乱されにくく直接的な相互作用が低減される、すなわちタンパク質の吸着が抑制されることが判明した（石原）。生体高分子と材料の水和状態を熱分析により測定し、両者に共通する中間水の構造に特徴が見られることが判明した（田中）。

一方、細胞で観察される事象の研究では、化学処理により、アパタイトが形成され易い状態のチタンほど、その上で培養した hMSC の遺伝子発現は、骨分化に関連する遺伝子発現が亢進していた。従来の骨分化に関する研究では、骨分化を促進するための増殖因子を添加した分化用培地がもちいられている。本研究では、骨分化を促進するための増殖因子を添加していない、通常の増殖用培地で実験を実施しているが、それでも化学処理したチタン上で培養した hMSC の骨分化誘導を示す遺伝子の発現亢進が確認された。（澤田）。組成比の異なる 5 種の PMEА/PHEMA 共重合体上で培養した hMSC は、細胞が接着しなかった組成比 0/100 の表面意外では、同様に紡錘体状を呈して増殖していた。しかし、そのタンパク質発現は、組成比 100/0 の表面では細胞骨格・細胞伸展に関するタンパク質発現の低下が観察された（加藤）。

D. 考察

PMEA は生体適合性が良い材料として知られている。すなわち、血球細胞、タンパク質等が付着しにくい材料とされている。しかしながら、本研究で hMSC を PMEА 上で培養し、細胞の遺伝子発現及びタンパク質発現を解析する実験を行った際、hMSC は問題なく PMEА に接着し、増殖した。一方、PMEA 表面への直接のタンパク質吸着量を測定した実験では、他の材料より少なかった。細胞接着に関しては、血

球系の細胞での結果を確認する必要があるが、従来の試験法での生体適合性の評価と、本研究で開発中の新規評価指標との相関性を明らかにすることで、これまでに知られていない興味深い知見がでてくることも期待される。

また、本研究では金属材料チタンも研究対象としている。一般的に光透過性の材料表面の簡易な観察、また、その上で培養する細胞の形態、増殖状態は、位相差顕微鏡を用いて簡便にできる。しかし、チタンのように光を通さない材料では、増殖している細胞を直接観察することは困難である。細胞状態を観察せずに、回収した細胞数を計数することで増殖を確認することも可能であるが、細胞形態から得られる非常に重要な情報は得ることができない。本研究では共焦点顕微鏡を用いて、蛍光色素で染めた細胞の形態、増殖状態を直接観察して、チタン上で培養した細胞の形態情報も確認し、チタンという金属材料の上でも、hMSC 本来の紡錘型の形状を呈して増殖することも、確認した。

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て、低い。来年度は、hMSC の遺伝子発現及びタンパク質発現解析をアルカリ処理チタン上でを行い、アパタイト形成能及びタンパク質吸着能との比較を行いたい。

研究初年度では、各研究分担者が、それぞれの材料及び手法を使った研究報告がなされた。来年度からは、組成比の異なる PMEА/PHEMA 共重合体を共通の試験材料として、各研究者の手法を用いた観察指標間での比較ができるようにしたい。材料調製に未解決の問題があり、年度当初にこの問題を解決して、安定した材料

を使ったより正確なデータを収集する。

E. 結論

初年度の研究からは、下記の2点について、複数の研究分担者の結果から結論として導きだせる。

1. 血液適合性が良いとされているPMEAについて、吸着タンパク量は他の材料よりも少なく、また、その上で培養したhMSCのタンパク質発現解析から、細胞形態や細胞接着に関わるタンパク質や細胞外マトリックスの発現が低下していたことは、材料特性と一致した結果になった。しかし、PMEA上でhMSCは接着し、増殖したことは、材料特性とは矛盾する結果となった。今後、原因を究明したい。

2. 材料氷面近傍の中間水の存在がタンパク質吸着を抑制するメカニズム

材料表面の中間水は高い運動性を有しており、また、タンパク質は周囲の水和層によりその構造・活性が維持されている。それぞれに存在する水の層に妨げられて、材料とタンパク質は直接的な相互作用が低減され、結果として、タンパク質の材料への吸着が抑制されるというメカニズムが推定された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子：再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み
シーエムシー出版、東京(2012), pp. 38-46
「第1章 5節 次世代医療機器評価指標作成事業—再生医療分野—」
- 2) 迫田秀行、松岡厚子：デラミネーション破壊

の再現と内部クラック観察 臨床バイオメカニクス, 33, 303-309 (2012)

- 3) 迫田秀行, 京本政之, 井上祐貴, 石原一彦, 松岡厚子：人工関節摺動面材料の形状変化による摩耗量評価の可能性の検討
臨床バイオメカニクス, 33, 311-315(2012)
 - 4) 河上強志, 伊佐間和郎, 中島晴信, 吉田仁, 大嶋智子, 大野浩之, 上村仁, 塩田寛子, 菊地洋子, 松岡厚子, 西村哲治：有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律(有害物質含有家庭用品規制法)におけるトリフェニル錫(TPT)及びトリブチル錫(TBT)の試験法改定に係わる検討
薬学雑誌, 132, 1197-1208(2012).
 - 5) Haishima Y, Isama K, Hasegawa C, Yuba T and Matsuoka A.: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration.
J. Biomed. Mater. Res. Part A, in press (2013).
 - 6) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y and Matsuoka A.: Calcium-incorporated titanium surface influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.
J. Biomed. Mater. Res. Part A, in press (2013).
- ### 2. 学会発表
- 1) 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 松岡厚子：間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1) - 蛋白質の網羅的発現解析による検討 -
第11回日本再生医療学会 (2012.6)(横浜)
 - 2) 中岡竜介, 河野健, 澤田留美, 平野義明, 松岡厚子：細胞接着性ペプチド修飾アルギン酸ゲル中で3次元培養したヒト細胞の分化挙動に関する研究
第11回日本再生医療学会総会 (2012.6)(横浜)

- 3) 澤田留美, 齧島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子: 間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(2)—遺伝子発現の網羅的解析による検討—
第11回日本再生医療学会総会 (2012.6)(横浜)
- 4) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田譲治, 松岡厚子: in vitro における同種軟骨細胞(シート)の免疫応答におよぼす影響
第11回日本再生医療学会総会 (2012.6)(横浜)
- 5) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 中野達也, 瀬川勝智: 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第1報)
第41回医用高分子シンポジウム (2012.6)(目黒区)
- 6) Isama, K., Kawakami, T., Sakai, K., Miyajima, A., Matsuoka, A.: Effect of nanoparticles on the cytotoxicity of coexisting metal salts. (共存する金属塩の細胞毒性に及ぼすナノ粒子の影響)
48th Congress of European Societies of Toxicology (2012.6) (Stockholm, Sweden)
- 7) 植松美幸, 坂本怜, 市橋琢弥, 安里権也, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関 洋: Development of intraoperative navigation system designed for Aortic Vascular Treatment(大動脈瘤治療を対象にしたナビゲーションシステムの開発)
第21回日本心血管インターベンション治療学会学術集会 (2012.6)(新潟)
- 8) Nakaoka, R., Matsuoka, A.: Effects of surface functional groups on interacted-cell behavior: Effect on gap-junctional intercellular communication of cells(表面官能基が表面と相互作用した細胞の挙動に与える影響について: 細胞間連絡機能への影響)
The 9th World Biomaterials Congress (2012.6) (Chengdu, China)
- 9) Isama, K., Kawakami, T., Matsuoka, A.: Apatite formation on Ca-incorporated Ti-Zr based alloys in simulated body fluid. (擬似体液浸漬によるカルシウム導入した Ti-Zr 基合金のアパタイト形成)
The 9th World Biomaterials Congress (2012.6) (Chengdu, China)
- 10) 伊佐間和郎, 河上強志, 酒井恵子, 宮島敦子, 松岡厚子: 金属塩の細胞毒性に及ぼすナノマテリアルの影響
第39回日本毒性学会学術年会 (2012.7) (仙台)
- 11) 松岡厚子, 山根隆志: 神戸大学シンポジウム 8 経済産業省・厚生労働省連携事業「次世代医療機器開発ガイドライン・評価指標作成事業」の7年間を振り返って
第2回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2012.9)(千代田区)
- 12) 迫田秀行, 松岡厚子: 打ち抜き試験による高度架橋超高分子量ポリエチレンの機械特性評価
日本機械学会 M&M2012 材料力学カンファレンス (2012.9)(松山)
- 13) 伊佐間和郎, 河上強志, 松岡厚子: カルシウム導入したジルコニウムのイオン吸着挙動とアパタイト形成能
日本金属学会 2012 年秋期講演大会 (2012.9)(松山)
- 14) 澤田留美, 加藤玲子, 松岡厚子: 再生医療製品の評価指標について一次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野—
第6回医療機器レギュラトリーサイエンス研究会 (2012.9)(江東区)
- 15) Isama K, Kawakami T, Sakai K, Miyajima A, Matsuoka A.: Effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles on the cytotoxicity of metal salts. (金

- 属塩の細胞毒性に及ぼす SiO₂ 及び TiO₂ ナノ粒子の影響)
European Society of Toxicology in Vitro 2012 International Conference (2012.10) (Lisbon, Portugal)
- 16) 加藤玲子、佐藤正人、小久保舞美、河毛知子、持田讓治、宮島敦子、松岡厚子：積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響
第 50 回日本人工臓器学会 (2012.11)(福岡)
- 17) 迫田秀行、松岡厚子：人工股関節における内部クラックとデラミネーション破壊
日本臨床バイオメカニクス学会 (2012.11)(千葉)
- 18) 齧島由二、福井千恵、柚場俊康*, 松岡厚子：溶血性試験用陽性対照材料の開発と性能評価
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 19) 齧島由二、河上強志、福井千恵、田上昭人、柚場俊康、伊佐間和郎、松岡厚子：DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発：可塑剤溶出量と溶血性の関係について
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 20) 中岡竜介、比留間瞳、松岡厚子：ベタイン構造を模倣・単純化したモデル表面の調整に関する研究
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 21) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子カルシウム導入したチタン及びジルコニウムの疑似体液浸漬によるアパタイト形成
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)(仙台)
- 22) 澤田留美、河野 健、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—がん化の指標探索のための遺伝子発現解析—
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 23) 迫田秀行、齧島由二、松岡厚子：スクアレンによる超高分子量ポリエチレンの劣化機構に関する検討
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 24) 迫田秀行、松岡厚子：超高分子量ポリエチレンの摩耗特性へのスクアレンの影響
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 25) 植松美幸、齧島由二、中岡竜介、松岡厚子、瀬川勝智、中野達也：医用高分子材料の表面近傍における水和状態のシミュレーション的評価
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 26) 河野 健、澤田留美、伊佐間和郎、齧島由二、松岡厚子：チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11) (仙台)
- 27) 植松美幸、市橋琢弥、安里権也、梅津光生、中岡竜介、松岡厚子、飯村 浩、青見茂之、山崎健二、鈴木孝司、村垣善浩、伊関 洋：TAAA Navigator の開発と臨床的評価の実際
第 21 回日本コンピュータ外科学会大会 (2012.11)(徳島)
- 28) 市橋琢弥、植松美幸、安里権也、梅津光生、中岡竜介、松岡厚子、東 隆、山崎健二、鈴木孝司、村垣善浩、伊関洋：弓部大動脈用ステントグラフト留置過程のデータに基づく可視化に向けた初期的検討
第 21 回日本コンピュータ外科学会大会 (2012.11)(徳島)

29) 安里権也, 植松美幸, 市橋琢弥, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村 浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 解剖学的特徴点計測における誤差評価についての実験的検討

第 21 回日本コンピュータ外科学会大会 (2012.11)(徳島)

30) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也: 医用高分子材料の生体適合性評価指標開発に向けた分子動力的シミュレーション

第 50 回日本人工臓器学会 (2012.11)(福岡)

31) 伊佐間和郎, 河上強志, 酒井恵子, 宮島敦子, 松岡厚子: 金属塩の細胞毒性に及ぼすナノ粒子の影響

第 49 回全国衛生化学技術協議会年会 (2012.11)(高松)

32) 植松美幸, 市橋琢弥, 安里権也, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村 浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関 洋: 開胸を伴う手術でのナビゲーションを用いた体表から体内の標的血管へのアプローチ決定

第 25 回日本内視鏡外科学会総会 (2012.12)(横浜)

33) 齧島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 伊佐間和郎, 松岡厚子. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: 可塑剤溶出量と溶血性の関係について 日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月・横浜).

34) 齧島由二, 澤田留美, 福井千恵, 松岡厚子. 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 蛋白質発現の網羅的解析による検討

第 12 回日本再生医療学会総会 (2013 年 3 月・横浜).

35) 澤田留美, 齧島由二, 福井千恵, 河野 健,

松岡厚子. 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 遺伝子発現の網羅的解析による検討

第 12 回日本再生医療学会総会 (2013 年 3 月・横浜)

36) 河野 健, 澤田留美, 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」

第 12 回日本再生医療学会総会 (2013 年 3 月・横浜)

3. その他

松岡厚子: 和英対訳 医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方について
薬事日報社 (2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

表1 分担研究で使用了材料、細胞及び觀察指標の一覧（平成24年度）

研究分担者	材料	細胞又は擬似体液等	觀察指標
藪島	PSF, PMEA/PHEMA	ヘパリン加ヒト血漿	接触角、 タンパク質吸着
宮島	PMEA/PHEMA, PMPC, チタン	CHL, A549	細胞増殖、毒性、 小核試験
中岡	自己組織化膜	V79	接触角、細胞占有面積
伊佐間	チタン	擬似体液	イオン吸着、表面組成
澤田	チタン、PMEA/PHEMA	hMSC	遺伝子発現
加藤	PMEA/PHEMA	hMSC	タンパク質発現
迫田	PMPC-PEEK	潤滑液（牛血清水溶液）	摩擦係数、摩擦量
植松	PMEA（仮想）	水（仮想）	水和状態 （仮想及び実測）
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	PCBMA	水	中間水 （低温結晶形成）
石川	ポリマーブラシ（仮想）	関節液（仮想）	潤滑状態（仮想）

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
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名

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	齧島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
研究協力者	田中 賢	山形大学大学院理工学研究科
	棚橋 一裕	東レ先端材料研究所
	中岡 竜介	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
	福井 千恵	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
	比留間 瞳	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

研究要旨

平成 24 年度の本研究では、高分子材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から予測する評価系の確立を目指し、PVP 含有 PSF 及び PHEMA/PMEA ランダム共重合体表面に吸着する血漿蛋白質の網羅的比較定量解析を行った。

PSF/PVP 材料表面には、内因系血液凝固活性化リガンドである VTNC や各種の血液凝固因子が有意に濃縮されたが、血液凝固因子 XII、キニノゲン、C1RL 及び C4 系を除く補体、並びに抗体の吸着は PVP 添加量を増加させることにより抑制されることが判明した。組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体表面への蛋白質吸着挙動を解析した結果、第 IX 因子を除き、血液凝固因子は全ての材料上で濃縮されることが判明した。VTNC は全ての材料上で濃縮されたが、最も良好な血液適合性を示す PMEA 表面への吸着量はその他の表面と比較して低い値を示した。補体、補助因子及び抗体は PMEA を除く全ての表面上で濃縮されたが、PMEA 表面では C1QC、C1RL 及び極一部の抗体を除き、これらの濃縮が起こらないことが確認された。また、PMEA 表面では血液凝固関連蛋白質以外の蛋白質の濃縮も抑制されることが判明した。

昨年度に実施した対照材料の解析結果を含めて比較検討することにより、1) 内因系血液凝固活性化リガンドとして VTNC 及び FINC、2) 補体及び補助因子として C1r、C1s、C3、C5 及び FHR1、3) 血液凝固因子として FA7、FA9、FA12 及び FIBB、4) その他の蛋白質として GPX3 及び PLD5 を血液適合性評価マーカーとして選定した。今後、これらのマーカー蛋白質の絶対定量を行い、各種材料が示す血液適合性との相関性を検証する。

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。

インプラント型の循環器系医療機器では、長期間に渡って血液凝固や血栓形成等を起こさないことが要求される。血液適合性の評価としては、血栓形成、血液凝固、血小板、溶血性及び補体系の5つの試験項目が存在するが、未だ国際的に十分整合されていない状況にある。そこで本研究では、バイオインターフェースの特性に着目した医用材料の新規評価方法を開発することを目的として、高分子材料表面への蛋白質吸着挙動と血液適合性の相関性について検討している。対照材料であるポリスルホン (PSF)、ポリエ

チレンテレフタレート (C-PET)、三酢酸セルロース (CTA)、ポリスチレン (PS)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 及び超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) への血漿蛋白質の吸着挙動解析は昨年度までに実施した一連の試験において終了している。平成24年度の本研究では、血液適合性評価マーカーとなり得る蛋白質を選定するため、比較的優れた血液適合性を有する材料であるポリビニルピロリドン (PVP) 含有 PSF のほか、ポリ-2-ヒドロキシエチルメタアクリレート (HEMA)、ポリ-2-メトキシエチルアクリレート (PMEA) 及び両高分子のランダム共重合体表面に吸着する血漿蛋白質の網羅的比較定量解析を行った。

B. 研究方法

(1) 高分子材料

高分子材料としては、PVP 含量の異なる PSF シート (表 1) のほか、HEMA、PMEA 及び組成比の異なる PHEMA/PMEA ランダム共重合体 (混合比 75:25、50:50、25:75 w/w%) を両面にコーティングした三菱樹脂製 Pre-coated PET シート (ダイアホイール) を使用した (表 2)。

(2) PHEMA/PMEA 表面の作製

PHEMA、PMEA 及び組成比の異なる PHEMA/PMEA ランダム共重合体 (混合比 75:25、50:50、25:75 w/w%) のメタノール溶液 (1 w/v%、125 μ L) を予めメタノールで洗浄した三菱樹脂製ダイアホイール (ϕ 35 mm、厚さ 0.075 mm) の中央に滴下し、KYOWARIKEN 製スピンコータ (K-359SD-1 SPINNER : 500 rpm/5 sec \rightarrow 1000 rpm/10 sec \rightarrow 4000 rpm/10 sec) を利用して均一にコーティングし、乾燥後、同様の操

作を繰り返した。片面のコーティングが終了した後、もう片面を同様に処理して両面コート PET シートを作製した。

(3) 表面解析

3-1. 静的接触角

3-1-1. 液滴法

1 x 1 cm に裁断した各材料上にミリ Q 水 10 μ L を滴下し、120 秒後に ERMA 接触角測定器 (G-1-1000) を用いて液滴の幅と高さを計測して以下の計算式から接触角 (δ) を求めた。

$$L^2 = (w/2)^2 + (1-h)^2$$

$$\sin \delta = (w/2)/L$$

L: 液滴の半径 (mm)

w: 液滴の幅 (mm)

h: 液滴の高さ (mm)

δ : 接触角

3-1-2. 水中気泡法

透明なプラスチックケース (縦 6.5 x 横 5.5 x 高さ 2.5 cm) にミリ Q 水を満たし、同様に裁断した材料を測定面を下にして浸漬し、マイクロピペット及び湾曲させた注射針を使用して、材料下部に 2 μ L の気泡を形成させた後、上記と同様の方法により接触角を測定した。

3-2. SEM 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 2000 倍又は 5000 倍で観察した。

(4) 血漿蛋白質の吸着と回収

8 x 10 cm に裁断した PVP 含有 PSF シート (1 枚/サンプル)、PHEMA/PMEA をコーティングした PET シート (10 枚/サンプル) をそれぞれ個別に 15 ϕ cm ガラス製シャーレ中で 45 ml (PVP 含有 PSF 材料) 又は 25 ml (PHEMA/PMEA 材料) のヘパリン加ヒト血漿 (コージンバイオ) に 37°C で 2 時間緩やかに振とう/浸漬した後、同血漿を除去した。次いで、同材料を氷冷した 1 mM PBS により 5 回洗浄した後、20 ml の Chaotropic Membrane Extraction Reagent 2 (Sigma-Aldrich) 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 2 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。対照試料として、尿素変性ヒト血漿蛋白質を同様の方法により調製した。

(5) 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 μ g) を含む Reagent 3 溶液 8 μ l に 50 mM NH_4HCO_3 (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 16 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バリアン社製 OMIX Tip (C18, 100 μ l) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、0.2 μ g/ μ l 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 分析に供した。

(6) 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、HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を装備した ADVANCE NanoUPLC (AMR) 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)、CERI 社製 L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3 µm, 12 nm) を使用した。イオン源としては、バックグラウンド低減装置 (AMR 製 ABIRD) を装備した AMR 社製 Captive Spray イオン源を使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 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 300-1400, Lock mass = フタル酸ジエチルヘキシル及びシロキサン, 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 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% 酢酸) と B 溶媒 (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 (1.0 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 150 分とし、サンプル注入後、0-40%B/125 min → 40-55%B/130 min → 100%B/135 min → 100%B/140 min → 0%B/150 min のグラジエント条件により溶出した。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=2 とした。

(7) 蛋白質の同定と定量

6-1. Reject Mass List の作成

蛋白質の同定とアノテーション解析 (Functional analysis) は 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 v1.3 を用いて行った。検索エンジン及びデータベースとしては、それぞれ Mascot 及び UniProt/Swiss-prot を利用した。

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、MS/MS スペクトル相同性に基いたピークマッチングとリテンションタイム補正を行うことにより、蛋白質の比較定量解析を行った。

C. 研究結果

(1) 高分子材料の表面構造と特性評価

1-1. PVP 含有 PSF シート

各シートの PVP/PSF 仕込比、最終的な PVP 含量及び蛋白質吸着量を表 1 に示した。最も多量の PVP を含有する PSF1 シートへの蛋白質吸着量は 10.38 µg/cm² であった。

各シートに吸着する蛋白質量は PVP 含量が低下するに従って増加する傾向が認められたが、PVP 不含の PSF シート (PSF6) への蛋白質吸着量はその他のシートと比較して明らかに低い値を示した。

各材料の表面構造を SEM 解析により観察した結果 (図 1)、PSF1-4 は明瞭なポア構造を有する多孔性材料であることが確認された。PVP5 にも部分的にポア構造が認められたが、PVP 不含の PSF6 にはポア構造が観察されなかった。

各材料の静的接触角を液滴法により測定した結果 (表 3)、PSF1 の接触角は 51.2 度 (非ガラス面) であり、比較的親水性が高いことが確認された。その他のシートの接触角は PVP 含量の低下に伴って上昇し、疎水性が徐々に増加することが確認された。

1-2. PHEMA/PMEA 材料

PET シートにコーティングした PHEMA/PMEA 組成比、各シートの吸着蛋白質量と静的接触角を表 2 に示した。最も良好な血液適合性を持つ PMEA 表面 (サンプル番号 5) に吸着する蛋白質量は $0.19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。吸着蛋白質量は PHEMA 含量が上昇するに従って、増加する傾向が認められたが、PHEMA 表面 (サンプル番号 1) への吸着量は PHEMA/PMEA ランダム共重合体表面 (サンプル番号 2-4) と比較して若干低い値を示した。

PMEA 表面は液滴法及び水中気泡法ともに 36.8 度の静的接触角を示し、比較的親水性に富むことが確認された。水中気泡法においては、水酸基を有する PHEMA の含量増加に伴って、接触角が低下する傾向が観察された。PHEMA/PMEA ランダム共重合体表面は液滴法においても PMEA 表面

より低い接触角を示したが、PHEMA 表面の接触角は 43.6 度であり、見かけ上、親水性が若干低下することが認められた。液滴法では乾燥表面に水を滴下した直後に接触角を測定する。一方、水中気泡法では試料を十分水和させた後に接触角を測定するため、両法における PHEMA 表面の接触角の相違は水分子と相互作用する時間の違いに由来するものと思われる。

蛋白質吸着実験前後の PMEA 及び PHEMA 表面の SEM 画像を図 2 に示した。蛋白質吸着実験には洗浄工程を含めて 5 時間程度を要するが、処理後においても、両表面ともにコーティングした高分子材料の剥離は観察されなかった。

(2) 吸着蛋白質の解析

等量の血漿蛋白質及び各材料表面に吸着した蛋白質試料を 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を行った結果、PVP 含有 PSF 材料では 1694 ($p < 0.05$)、PHEMA/PMEA 材料では 731 ($p < 0.05$) 種類の蛋白質が同定された。これらのうち、血液凝固に関与すると思われる蛋白質は、それぞれ 191 及び 170 種類存在した。

アルブミンは PVP 含有 PSF 及び PHEMA/PMEA 材料ともに吸着したが、その吸着量は吸着蛋白質 (AP) / 血漿蛋白質 (PP) 比として、それぞれ 0.07-0.26 倍及び 0.004-0.04 倍であり、材料表面上で濃縮される現象は認められないと共に、非吸着の血漿成分は洗浄工程により効率良く除去されていることが確認された (表 4)。血液凝固に関与する一連の血漿蛋白質も全ての材料表面に吸着したが、その吸着挙動は材料毎に異なっていた。

2-1. ホスホリパーゼ群 (表 5)

2-1-1. PVP 含有 PSF 材料

血小板セロトニン受容体の下流に存在する PLC に関連する蛋白質として、PLCL2 が同定された。同蛋白質は PSF5 上で有意に濃縮されたが、その他の材料表面では濃縮現象が観察されなかった。血小板コラーゲン/トロンビン/エピネフリン受容体の下流に存在する PLA₂ に関連する蛋白質として、PA24F が同定された。同蛋白質は PVP を含有する材料群 (PSF1-5) に AP/PP 比として 2 倍以上吸着したが、PVP 不含の PSF 材料 (PSF6) では濃縮現象が認められなかった。その他のホスホリパーゼ群として、PHLD 及び PLD1 が同定されたが、PHLD の濃縮は PSF4 を除き認められなかった。また、PLD1 の AP/PP 比も全ての材料ともに 0.5 未満であった。

2-1-2. PHEMA/PMEA 材料

PLC 関連蛋白質として PLCH1、その他の蛋白質として PHLD が同定された。PLCH1 の濃縮現象は PMEA 表面上では観察されなかったが、PHEMA 及び PHEMA を含むランダム共重合体表面には AP/PP 比として 9 倍以上濃縮されることが確認された。PHLD は対照として使用した血漿蛋白質の測定では検出されなかったが、PHEMA/PMEA 材料には吸着することが確認された。

2-2. セロトニン受容体群 (表 6)

PVP 含有 PSF 材料の分析では、セロトニン関連蛋白質として ASML が同定された。同蛋白質は比較的多量の PVP を含有する PSF1 及び PSF2 表面には AP/PP 比として 2 倍以上吸着したが、その他の材料では顕著な濃縮現象が観察されなかった。

一方、PHEMA/PMEA 材料の解析において、セロトニン受容体関連蛋白質は同定されなかった。

2-3. 血小板 α 顆粒成分群 (表 7)

PVP 含有 PSF 及び PHEMA/PMEA 材料の解析ともに血小板 α 顆粒成分関連蛋白質として、A1AT が同定された。両材料の解析における同蛋白質の AP/PP 比は、それぞれ 0.07-0.65 及び 0.01-0.03 であり、いずれの材料においても顕著な吸着は認められなかった。

2-4. 血小板因子群

PVP 含有 PSF 及び PHEMA/PMEA 材料の解析ともに、PLF4 等の血小板因子関連蛋白質は同定されなかった。

2-5. カリクレイン・キニン群 (表 8)

PVP 含有 PSF 及び PHEMA/PMEA 材料の解析ともにカリクレイン・キニン関連蛋白質として、KLKB1 及び KNG1 が同定された。両材料の解析における KLKB1 の AP/PP 比は、それぞれ 0.11-1.93 及び 0.02-0.16 であり、いずれの材料においても顕著な濃縮現象は認められなかった。PHEMA/PMEA 材料の解析における KNG1 の AP/PP 比は 0.14-1.08 であった。PSF1、PSF2 及び PSF6 に吸着した同蛋白質の AP/PP 比も、それぞれ 0.78、1.11 及び 0.18 であり、これらの表面への KNG1 の濃縮現象は観察されなかったが、PSF3、PSF4 及び PSF5 表面には AP/PP 比として 2 倍以上濃縮されることが確認された。

2-6. 血液凝固因子群 (表 9)

2-6-1. PVP 含有 PSF 材料

血液凝固因子群として、13 種類の蛋白