

ーションした後、10% トリフルオロ酢酸 (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 OMIX Tip (C18, 100 μ l: VARIAN 社) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) にて乾燥させた後、0.2 μ g/ μ l の濃度になるように TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析するまで 4°C で保存した。

7. LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、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 (Thermo Scientific) 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 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm; CERI)、L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3 μ m, 12 nm; CERI) 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 Captive Spray イオン源 (AMR) 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 300-1,400; Lock mass = シロキササン及びフタル酸ジエチルヘキシル; 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 μ g) はオートサンプラーを使用した。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 \rightarrow 40-55%B/130 min \rightarrow 100%B/135 min \rightarrow 100%B/140 min \rightarrow 0%B/150 min のグラジエント条件により溶出した。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=2 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 (8 参照) 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。

8. タンパク質の同定と定量

8-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データをタンパク質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア v1.3 (Thermo Scientific) 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タンパク質同定を行った後、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 \pm 1 分に設定した。

8-2. 比較定量解析

タンパク質の多変量解析は i-RUBY ソフトウェア (メディカルプロテオスコープ)

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 = 2 x 2)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タンパク質同定、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、タンパク質の比較定量解析を行った。

8-3. オントロジー解析とパスウェイ解析
タンパク質への機能情報付加とパスウェイ解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いて行った。

9. 倫理面への配慮

研究に用いた hMSC は LONZA 社より購入しており、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

(1) 播種後の細胞の形状と各シート表面

hMSC を播種して 30 分後での細胞の形状と各シートの表面の位相差顕微鏡写真を図 1 に示す。いずれのコーティングシートおよび TCPS 上でも hMSC は丸く、まだ付着していなかった。シートの表面状態は M25H75 でのみ、場所によっては亀裂が観察された (図 2)。データは示していないが、位相差顕微鏡観察下において、hMSC は 5 時間後には TCPS を含め、すべてのシート上で、揺らしてもその場に留まり動かなくなっており、24 時間後には紡錘状になり、回収時の 48 時間後も同様の形状を保っていた (図 3)。

(2) タンパク質発現比較解析

得られた MS データを i-RUBY ソフトウェアを用いたデータベース検索した結果、

peptide content が 2 以上あった 2102 個のタンパク質の内、TCPS 上の培養に対して発現量が 2 倍以上になったタンパク質は PET で 118 個、M100 で 26 個、M75H25 で 139 個、M50H50 で 372 個、M25H75 で 44 個同定された。一方、発現量が 1/2 以下に減少したタンパク質は PET で 46 個、M100 で 1544 個、M75H25 で 29 個、M50H50 で 39 個、M25H75 で 678 個であった。(表 1: すべて $p < 0.05$)

次に、IPA を用いて TCPS 上の培養に対して発現量が 2 倍以上および 1/2 以下になったタンパク質が関与すると思われる生体機能検索を行った結果、各材料条件において、特に分子細胞機能に関与する上位 5 個の機能について表 2 に示した。中でも変動したタンパク質数が多くみられた、細胞の集合および組織化や細胞機能と維持に関わる機能に着目して、関連するタンパク質群について発現挙動を検討した。

表 3-1、表 3-2 に細胞骨格関連タンパク質群の発現変化を示す。TCPS に比べて PET と M75H25 はほとんど変化がないのに対して、M100 はアクチン関連タンパクだけでなく、Ena/VASP ファミリーのタンパク質である Vasodilator-stimulated phosphoprotein や Protein enabled homolog といった、細胞接着やアクチンの再構築部に会合する細胞骨格の重要な制御因子を含め全体的に発現低下がみられた。M50H50 では前述の Protein enabled homolog を含め発現上昇傾向がみられた。

表 4、表 5 にはそれぞれ細胞伸展関連タンパク質群の発現挙動と細胞接着関連タンパク質群を示しているが、いずれも PET と M75H25 はほとんど変化がないのに対して、

M100ではTCPSと比して有意に発現が低下している。一方、M50H50では2倍以上になってはいないが、PETとM75H25と比べると発現増加している傾向がみられている。

さらにM100がTCPS上の培養に対して発現量の変化したタンパク質数が多かったことから、発現変化の方向から生物学的機能が亢進されるか抑制されるかの予測解析した結果(図4)、先にあげた細胞の集合および組織化や細胞機能と維持に関わる機能だけでなく細胞生存に関する機能が抑制され、細胞死に関連する機能が亢進する可能性が示唆された。そこで他の材料上でもこれらの機能に関係するタンパク質の変化を確認した。表6に細胞生存関連タンパク質群の発現挙動を示しているが、M100以外のPET, M75H25およびM50H50では、確認したタンパク質のほとんどが、TCPSと有意差がなかった。表7では発現が抑制されると細胞死を亢進するタンパク質群について検討しているが、M100で著しい発現低下が観察されるのに対して、M50H50では発現上昇しているタンパク質もあるが、ほとんどがTCPSと差がなく、TCPSと比べて細胞死を抑制しているとまでは言えない。PETおよびM75H25での発現もTCPSと同様の傾向であった。

先述のように、M100において細胞の形態に関するタンパク質群の発現がTCPSに比して低下していたことから、細胞外マトリックスに関するタンパク質群の発現挙動に着目し比較検討した。表8に細胞外マトリックス関連タンパク質群の発現挙動を示している。M100ではコラーゲンやフィブロネクチンだけでなく、ヒアルロン酸合成酵素およびヒアルロン酸のレセプターであ

るCD44を含む検討したタンパク質のほとんどが有意差ありで発現低下している。有意差がつかないタンパク質もTCPSに比して減少傾向がみられた。M50H50では逆にコラーゲンやフィブロネクチンなどが有意に高発現しているだけでなく、TCPSと比べて有意に発現低下しているタンパク質はなく、全体的に増加傾向がみられた。PETおよびM75H25での発現はほとんどTCPSと同様の傾向であった。

一方、インテグリン自身は細胞外マトリックスではないが、細胞外マトリックスとの相互作用を介して細胞機能を制御していることから、インテグリンの発現に着目したところ、M100では有意に発現減少がみられた。一方、PET, M75H25およびM50H50では、M50H50で若干上昇傾向がみられたが、いずれも有意な増減はみられなかった。

D. 考察

本研究では、表面構造の違いがhMSCに与える影響を細胞のタンパク質発現レベルで検討する目的で、組成比の異なるPMEA/PHEMAランダム共重合体でコーティングした材料の上で培養したhMSCのタンパク質発現の網羅的解析を行った。

各コーティングシート上に播種したhMSCはTCPS上と同様に顕微鏡観察下においては48時間後には一面に接着していた。しかしながら今回の実験では、播種30分後のM25H75の表面にひび割れ状態が観察されており、コーティング状態が完全でなかったことが考えられることから、以降の考察ではM25H75を除いて論ずる。

TCPS上での培養と比較して、各シートでのhMSCのタンパク質発現変化(2倍以

上および 1/2 倍以下) を検討した結果、PET および M75H75 では、ほとんどのタンパク質で大きな変化がみられなかった。それに対して M100 は変化があったタンパク質が 1570 個と一番多く、そのほとんどのタンパク質で発現が低下していた (1544 個)。特に細胞形態や接着および細胞生存に関して正に制御するタンパク質や細胞死を負に制御するタンパク質が低下していたことから、細胞形態や接着および細胞生存を抑制し、細胞死を亢進している可能性が示唆された。ただし、今回は細胞数を正確に計測できていなかったため、実際の細胞数の比較はできていない。これは再検討する際の検討課題としたい。(予備検討でシートに 1×10^5 細胞播種した場合、24 時間後の細胞数は TCPS および各シート間で有意差はなく、播種した数とほぼ同数の 1×10^5 細胞前後が回収されていた。) 一方、411 個のタンパク質の発現変化が観察された M50H50 では、M100 とは逆に、変化したタンパク質のほとんど (372 個) で発現が高くなっており、中でも生体機能と高い関連性が示唆されたのは、細胞骨格関連タンパク質群であった。また、細胞外マトリックス関連タンパク質においてもその発現挙動が M100 では低下しているのに対して M50H50 は 2 倍以上ではなくても TCPS に比べて高い傾向がみられた。細胞外マトリックスはコラーゲン、エラスチンなどの繊維成分とプロテオグリカン、グルコサミノグリカンなどの非繊維成分、さらにこれらと細胞との接着を調節するフィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの接着物質などからなる物質であるが、生体内では、細胞や臓器を支持したり、境界になったりする以外に、細胞

の接着、細胞の分化・増殖および細胞の移動にも大きく関わっている。特にインテグリンは細胞外マトリックスとの相互作用を介して細胞死を回避し、細胞の増殖、分化、形質発現の制御を行っているタンパク質である。図 5 に M100 におけるインテグリンシグナルを示しているが、シグナルの下流に関わるタンパク質も発現低下している。その結果、細胞形態、細胞接着、細胞の分化、増殖および細胞の移動などの機能が落ちると推測される。実際、細胞形態や細胞接着に関わるタンパク質群の発現低下が観察されていることから、タンパク質レベルにおいて M100 では細胞形態や細胞接着機能が低下していることが示唆された。一方、PHEMA が混在すると、細胞骨格や細胞外マトリックス関連タンパク質の発現は TCPS と同等か高い傾向がみられた。PHEMA 表面は PMEA 表面と比べて、タンパク質が脱離しにくく、かつ変性しやすいことが知られており、PMEA に PHEMA を混在させたことで、PMEA 単独に比べて、表面により多くの変性タンパク質が吸着した状態が保たれるようになり、その変性タンパク質を介して hMSC との相互作用が強くなったと推測される。実際、研究分担者 薮島による組成比の異なる PMEA/PHEMA ランダム共重合体表面への血清タンパク質吸着挙動の解析の結果、複数のタンパク質で吸着量に違いがあることが示されている (本報告書 薮島の項、研究結果(2) 吸着蛋白質の解析を参照)。また、その強度は M50H50 までは PHEMA の量に依存することが示唆された。さらにその相互作用の強さが、hMSC での細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群

の発現の調節に働いているのではないかと考えられる。

ちなみに今回はコーティングの不具合により、議論しなかった M25H75 は M50H50 よりも M100 に近いタンパク質発現挙動を示していた。仮にこの傾向の再現性が取れば、単純に PHEMA の混合量だけでなく、接触角などとの関連性も検討したい。

E. 結論

今回の結果から、PMEA/PHEMA ランダム共重合体の組成比の違いが、コーティング表面上への吸着タンパク質の種類や量を変化させることを介して、hMSC の細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群の発現に影響をおよぼすことが示唆された。今後、コーティングの条件を再検討し、均一で剥がれたり亀裂が入ったりしないように作製したコーティング表面上で、hMSC を培養し、今回の結果の再現性を確認し（特に M25H75）、PMEA と PHEMA の混合比と表面構造（接触角など）の関係性とタンパク質レベルでの細胞挙動間の相関性を検討する。また、もともと P MEA は血液適合性が高く血液と直接接する循環器系医療機器などで用いられることから、細胞ソースを血液中の単核球もしくは単核球から分化してくる樹上細胞やマクロファージに変えて、組成比の異なる P MEA/PHEMA ランダム共重合体がこれらの細胞に与える影響を検討したい。

F. 研究発表 学会発表

1. Miyajima-Tabata A., Sakai K., Kato R., Matsuoka a.: Studies on cytotoxicity and

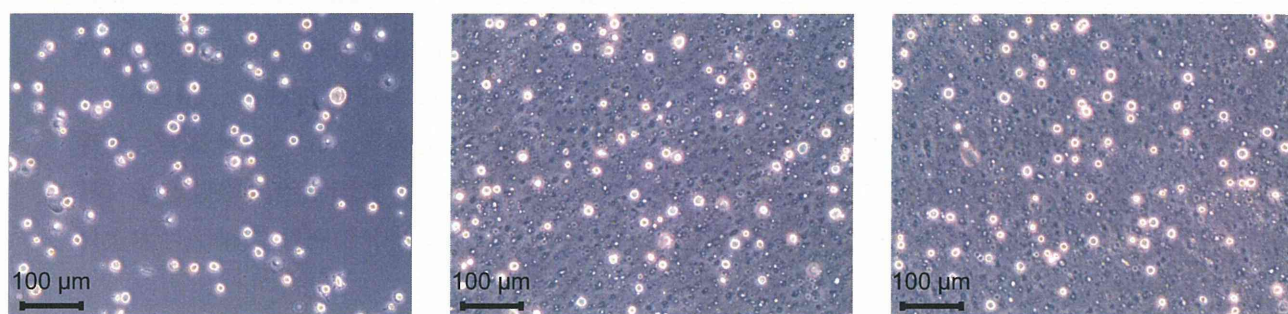
genotoxicity in CHL cells cultured on MPA polyers., Eurotox 2012 (Stockholm, 2012.6)

2. 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 持田譲治, 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大会 (2012. 11)

3. 宮島敦子, 加藤玲子, 酒井恵子, 松岡厚子「高分子医療材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性」

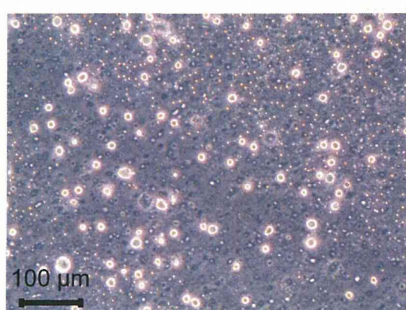
2012 バイオマテリアル学会 (2012. 11)



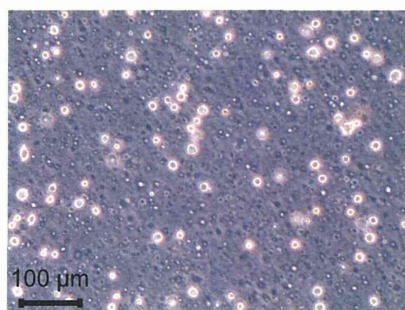
TCPS

PET

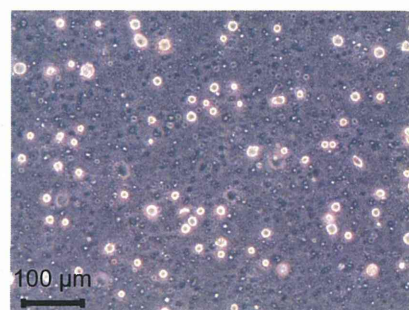
M100



M75H25



M50H50



M25H75

図1. 播種30分後の細胞形態

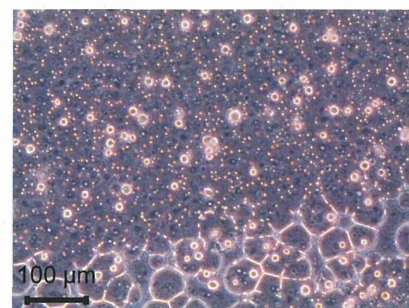
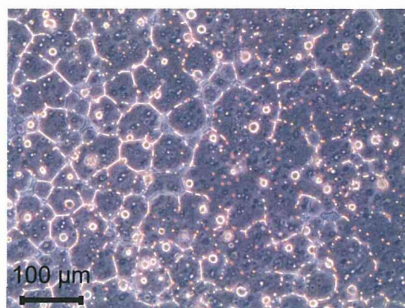
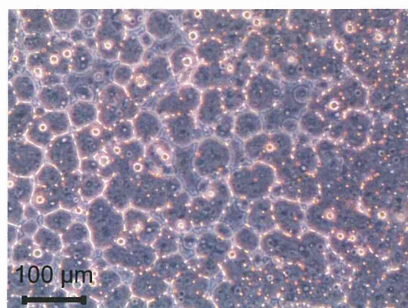


図2. 播種30分後M25H75の表面

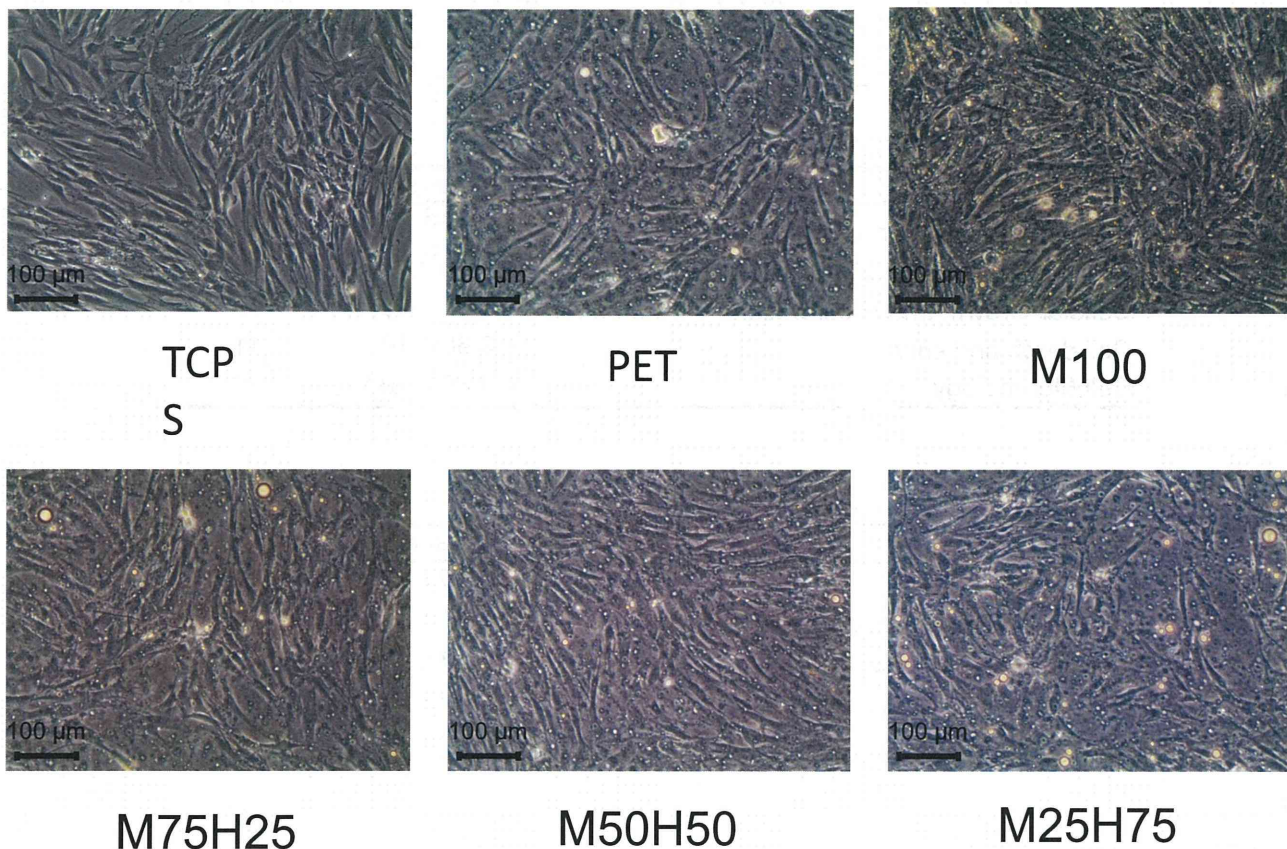


図3. 播種48時間後の細胞形態

表1. TCPS上での培養と比較してhMSCでの発現が変化したタンパク質数

Fold Change (vs TCPS)	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
5倍以上	12	9	14	18	9
2倍以上5倍未満	106	17	125	354	35
1/5以上1/2以下	39	1453	26	29	631
1/5未満	7	91(3)*	3	10(1)*	47(4)*
発現変化のあった タンパク質数	164	1570	168	411	722

peptide content 2以上のタンパク質の総数: 2102

* ()内は発現が認められなかったタンパク質の数

表2. ポリマーコーティングにより発現が2倍以上もしくは1/2倍以下になったタンパク質が関与する生体機能 (Top5)

Molecular and Cellular Function

PET

Name	p-value	# Molecules
Cellular Assembly and Organization	$< 3.68 \times 10^{-2}$	33
DNA Replication, Recombination, and Repair	$< 2.96 \times 10^{-2}$	14
Cellular Growth and Proliferation	$< 3.68 \times 10^{-2}$	16
Cell death and survival	$< 3.68 \times 10^{-2}$	41
Cell Morphology	$< 3.68 \times 10^{-2}$	20

M100

Name	p-value	# Molecules
Protein Synthesis	$< 2.15 \times 10^{-3}$	233
Cellular Assembly and Organization	$< 2.54 \times 10^{-3}$	357
Cellular Function and Maintenance	$< 2.49 \times 10^{-3}$	355
RAN Post- Transcriptional Modification	$< 2.49 \times 10^{-3}$	84
Gene Expression	$< 2.49 \times 10^{-3}$	140

M75H25

Name	p-value	# Molecules
Cellular Assembly and Organization	$< 4.77 \times 10^{-2}$	35
DNA Replication, Recombination, and Repair	$< 3.99 \times 10^{-2}$	14
Cellular Function and Maintenance	$< 4.77 \times 10^{-2}$	19
Nucleic Acid Metabolism	$< 1.94 \times 10^{-2}$	9
Small Molecule Biochemistry	$< 4.96 \times 10^{-2}$	22

M50H75

Name	p-value	# Molecules
Cellular Assembly and Organization	$< 1.87 \times 10^{-2}$	95
Cellular Function and Maintenance	$< 1.87 \times 10^{-2}$	93
Cellular Compromise	$< 1.87 \times 10^{-2}$	37
Cell Morphology	$< 1.87 \times 10^{-2}$	49
Drug Metabolism	$< 1.87 \times 10^{-2}$	9

M25H75

Name	p-value	# Molecules
Protein Synthesis	$< 2.38 \times 10^{-4}$	71
Gene Expression	$< 2.93 \times 10^{-3}$	43
RAN Post- Transcriptional Modification	$< 4.81 \times 10^{-7}$	31
Cellular Assembly and Organization	$< 4.36 \times 10^{-3}$	152
Cellular Function and Maintenance	$< 4.36 \times 10^{-3}$	132

表3-1. タンパク質比較定量解析結果:細胞骨格関連タンパク質群

■: 1/5倍未満 ■: 1/2倍以下 ■: 2倍以上

Protein name	Protein Score	Peptide count	Relative reation (sample/TCPS)					
			TCPS	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
A-kinase anchor protein 9	30.83	2	1.00	1.80	0.14	2.55	3.26	1.29
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	140.1	15	1.00	1.65	0.49	1.35	2.33	0.70
Actin, cytoplasmic 2	2599.88	68	1.00	0.72	0.27	0.57	0.98	0.41
Alpha-crystallin B chain	259.39	13	1.00	1.31	0.36	1.38	1.78	0.60
Angiotensin-converting enzyme	21.46	2	1.00	1.04	0.41	1.22	1.69	0.64
Arylsulfatase A	35.78	2	1.00	0.77	0.39	1.19	0.33	0.76
Beta-galactosidase	28.16	2	1.00	1.89	0.29	2.39	1.10	0.88
Calnexin	324.64	30	1.00	0.92	0.28	0.77	1.55	0.51
Caveolin-1	183.05	8	1.00	1.28	0.43	1.18	2.13	0.83
Cell division control protein 42 homolog	140.47	8	1.00	1.66	0.56	1.30	2.57	0.56
Choline-phosphate cytidyltransferase B	39.04	2	1.00	1.70	1.17	2.55	3.31	2.35
Cysteine and glycine-rich protein 1	182.91	11	1.00	1.34	0.31	0.99	2.36	0.44
Dihydropyrimidinase-related protein 2	435.52	29	1.00	1.25	0.39	1.03	1.58	0.43
Dihydropyrimidinase-related protein 3	261.15	20	1.00	1.32	0.48	1.02	1.73	0.41
Drebrin	154.15	5	1.00	1.55	0.72	1.18	2.56	1.44
Dynactin subunit 1	130.1	7	1.00	1.33	0.41	1.11	2.28	0.64
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	73.56	4	1	1.13	0.41	1.21	1.13	0.60
Protein enabled homolog	112.28	9	1.00	1.13	0.18	1.29	2.11	0.46
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	184.87	21	1.00	1.27	0.34	1.22	1.46	0.40
GTPase HRas	64.63	3	1.00	0.82	0.37	0.66	1.40	0.43
Heparin-binding growth factor 2	51.25	5	1.00	0.78	0.28	0.71	1.15	0.39
Hepatoma-derived growth factor	35.55	3	1.00	1.53	0.51	1.52	2.54	1.10
Importin subunit beta-1	631.15	28	1.00	1.04	0.37	1.13	1.35	0.77
Integrin-linked protein kinase	119.09	11	1.00	0.97	0.37	0.97	1.07	0.41
Kinesin-like protein KIF23	28.53	2	1.00	1.39	0.50	1.48	1.69	0.57
Laminin subunit gamma-1	158.21	10	1.00	1.23	0.47	1.18	1.79	0.83
Microtubule-associated protein 1A	78.58	10	1.00	1.69	0.42	1.21	1.63	0.39
Microtubule-associated protein 4	310.91	25	1.00	1.37	0.43	1.41	1.77	0.58
Mitogen-activated protein kinase 14	48.5	2	1.00	1.13	0.38	1.15	1.30	0.39
Neurofibromin	24.2	2	1.00	1.80	0.35	1.66	4.24	0.53
Nuclear mitotic apparatus protein 1	25.99	2	1.00	2.30	0.38	1.69	2.32	0.33
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	255.11	7	1.00	1.50	0.62	0.91	2.12	0.57
Plastin-2	53.26	4	1.00	1.49	0.30	1.23	1.31	0.36
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	93.21	8	1.00	1.06	0.38	0.95	1.52	0.60
Profilin-1	396	23	1.00	0.96	0.31	0.79	1.23	0.30
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	236.68	40	1.00	1.17	0.43	1.09	1.40	0.68
Protein diaphanous homolog 1	65.19	4	1.00	1.27	0.50	1.62	1.29	0.67
Radixin	282.29	22	1.00	1.16	0.43	1.08	1.42	0.41
Ras GTPase-activating protein SynGAP	25.48	3	1.00	1.23	0.24	1.02	0.34	1.02
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	819.68	53	1.00	1.28	0.47	1.26	1.52	0.43
Ras suppressor protein 1	110.46	8	1.00	1.06	0.38	1.22	1.36	0.38
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	107.58	6	1.00	1.33	0.44	1.28	1.21	0.66
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	63.75	2	1.00	1.19	0.36	1.08	2.02	0.62
Ras-related protein Rap-1A	217.37	9	1.00	1.21	0.46	1.46	1.32	0.85
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	164.84	13	1.00	1.08	0.45	1.09	1.44	0.37
Rho-related GTP-binding protein RhoG	36.02	2	1.00	0.94	0.22	0.77	1.84	0.52
Serine/threonine-protein kinase PAK 1	30.93	2	1.00	0.49	0.12	0.50	0.47	0.14
Sorting nexin-1	38.86	3	1.00	1.12	0.31	1.27	2.06	0.49
Spectrin beta chain, brain 2	82.27	9	1.00	1.25	0.45	1.26	2.07	0.84

表3-2. タンパク質比較定量解析結果:細胞骨格関連タンパク質群

Protein name	Protein Score	Peptide count	Rslative reation (sample/TCPS)					
			TCPS	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
Src substrate cortactin	169.9	12	1.00	0.93	0.26	0.95	1.61	0.33
Thrombospondin-1	216.12	22	1.00	1.10	0.28	1.04	1.55	0.64
Tubulin beta-3 chain	938.66	42	1.00	0.99	0.38	0.78	1.22	0.40
Twinfilin-2	74.91	4	1.00	1.27	0.34	1.05	1.50	0.18
Tyrosine-protein kinase Lyn	35.78	2	1.00	1.34	0.37	1.48	0.75	0.80
Ras-related protein Rap-1b	259.45	12	1.00	1.41	0.45	1.51	1.70	0.75
Ribosome-binding protein 1	813.58	53	1.00	1.07	0.32	0.94	1.64	0.40
Semaphorin-7A	36.75	2	1.00	1.04	0.25	0.98	1.65	0.69
Septin-9	232.41	21	1.00	1.14	0.48	1.03	1.99	0.58
Sorting nexin-2	36.82	4	1.00	1.18	0.38	0.99	1.84	0.33
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	554.56	32	1.00	0.97	0.31	0.78	1.26	0.41
Trophoblast glycoprotein	60.23	5	1.00	0.94	0.41	1.11	0.78	0.72

表4. タンパク質比較定量解析結果:細胞伸展関連タンパク質群

Protein name	Protein Score	Peptide count	Rslative reation (sample/TCPS)					
			TCPS	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
Calponin-2	214.54	12	1.00	1.00	0.34	0.95	1.50	0.86
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	63.49	5	1.00	1.16	0.38	0.91	1.76	0.30
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	29.87	2	1.00	1.34	0.19	1.28	1.83	0.26
Disabled homolog 2	64.6	3	1.00	1.06	0.31	0.53	1.24	0.18
Fibrillin-1	52.7	2	1.00	1.18	0.09	0.80	1.37	0.03
Fermitin family homolog 1	36.24	2	1.00	1.27	0.44	1.30	1.65	0.52
Filamin-B	1044.28	98	1.00	1.19	0.33	0.92	1.62	0.47
Filamin-C	1103.67	95	1.00	1.11	0.30	0.89	1.55	0.50
Galectin-1	488.92	17	1.00	0.67	0.23	0.62	0.77	0.20
Liprin-alpha-1	21.9	2	1.00	1.14	0.33	1.06	0.85	0.33
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	70.55	2	1.00	0.96	0.41	0.79	1.18	0.29
Myosin phosphatase Rho-interacting protein	37.78	2	1.00	1.18	0.29	0.70	1.54	0.36
Palladin	181.66	18	1.00	0.94	0.28	0.77	1.72	0.35
Programmed cell death 6-interacting protein	256.61	11	1.00	1.18	0.41	1.06	1.37	0.45
Periostin	37.1	2	1.00	1.17	0.37	1.47	0.51	0.73
Polypyrimidine tract-binding protein 1	597.52	31	1.00	1.06	0.42	0.98	1.44	0.75
Thrombospondin-2	47.21	2	1.00	1.28	0.32	1.21	1.72	0.49

表5. タンパク質比較定量解析結果:細胞接着関連タンパク質群

Protein name	Protein Score	Peptide count	Rslative reation (sample/TCPS)					
			TCPS	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
Cell division control protein 42 homolog	140.47	8	1.00	1.66	0.56	1.30	2.57	0.56
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	97.58	3	1.00	1.34	0.49	1.41	2.20	0.84
Fibronectin	3969.06	180	1.00	1.41	0.33	1.13	2.16	0.71
Rho-related GTP-binding protein RhoC	244.48	11	1.00	1.13	0.38	1.03	1.35	0.41
Transforming protein RhoA	263.77	12	1.00	1.13	0.36	0.98	1.42	0.49
GTPase HRas	64.63	3	1.00	0.82	0.37	0.66	1.40	0.43
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	107.58	6	1.00	1.33	0.44	1.28	1.21	0.66
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	554.56	32	1.00	0.97	0.31	0.78	1.26	0.41
Caveolin-1	183.05	8	1.00	1.28	0.43	1.18	2.13	0.83
Tropomyosin beta chain	637.93	42	1.00	1.40	0.38	1.27	1.93	0.89
Fermitin family homolog 2	336.48	18	1.00	1.19	0.41	1.22	1.72	0.39
Stathmin	116.45	6	1.00	0.57	0.21	0.32	1.14	0.15
Integrin beta-1	434.99	26	1.00	1.16	0.35	0.97	1.84	0.81
Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctior	69.91	4	1.00	0.62	0.25	0.80	1.54	0.38
Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	72.08	3	1.00	1.24	0.12	1.77	1.65	0.58

オレンジ: 機能を亢進、青: 機能を抑制

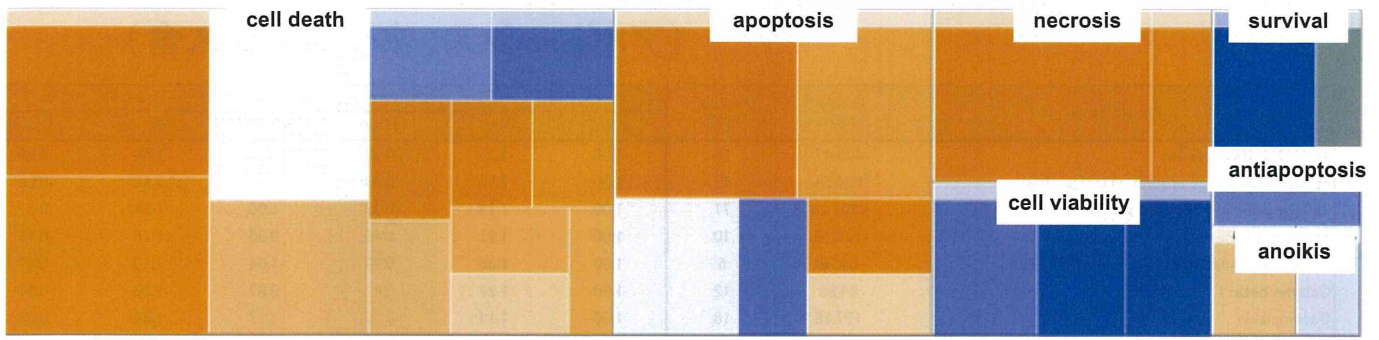


図4. M100における細胞生存・細胞死機能への影響

表6. タンパク質比較定量解析結果: 細胞生存関連タンパク質群

Protein name	Protein Score	Peptide count	Rslative reation (sample/TCPS)					
			TCPS	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	934.58	41	1.00	1.02	0.43	0.97	1.52	0.85
78 kDa glucose-regulated protein	1302.23	71	1.00	1.19	0.39	1.00	1.84	0.67
Acid ceramidase	118.31	2	1.00	1.03	0.48	1.27	1.14	0.84
Adenosine kinase	65	3	1.00	1.06	0.40	1.17	1.06	0.53
Angiotensin-converting enzyme	21.46	2	1.00	1.04	0.41	1.22	1.69	0.64
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain	116	7	1.00	1.17	0.41	1.07	1.64	0.48
Calpain-2 catalytic subunit	387.59	25	1.00	0.97	0.37	0.90	1.34	0.43
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	80.12	5	1.00	1.32	0.41	1.10	1.34	0.46
Catenin beta-1	84.86	12	1.00	1.23	0.41	0.97	1.20	0.90
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	46.67	2	1.00	0.83	0.23	1.00	1.23	0.41
Cysteinyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	61.72	5	1.00	0.86	0.16	0.84	1.29	0.33
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	82.9	5	1.00	1.26	0.38	1.38	1.55	0.62
Elongation factor 2	1768.67	72	1.00	1.13	0.36	1.02	1.43	0.46
Eukaryotic translation initiation factor 4E	38.15	4	1.00	1.73	0.32	1.90	1.70	0.72
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	153.67	15	1.00	1.06	0.39	0.88	1.50	0.62
GTPase HRas	64.63	3	1.00	0.82	0.37	0.66	1.40	0.43
Heat shock protein HSP 90-beta	1207.37	63	1.00	1.15	0.32	0.86	1.67	0.51
Heparin-binding growth factor 2	51.25	5	1.00	0.78	0.28	0.71	1.15	0.39
Histone deacetylase 1	64.81	3	1.00	1.27	0.30	1.10	1.09	0.57
Integrin-linked protein kinase	119.09	11	1.00	0.97	0.37	0.97	1.07	0.41
Major vault protein	456.98	43	1.00	1.12	0.44	1.00	1.59	0.67
PC4 and SFRS1-interacting protein	41.77	2	1.00	1.41	0.11	1.31	1.14	0.34
Peroxiredoxin-6	333.89	19	1.00	1.15	0.36	0.96	1.27	0.39
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	236.68	40	1.00	1.17	0.43	1.09	1.40	0.68
Proteasome subunit alpha type-4	215.93	11	1.00	0.91	0.37	0.98	1.23	0.54
Protein DJ-1	234.23	12	1.00	0.79	0.30	0.81	0.90	0.24
Protein NDRG1	95.15	2	1.00	1.08	0.48	1.01	1.06	0.44
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	39.65	2	1.00	0.82	0.36	1.07	1.26	0.62
Serine/threonine-protein kinase PAK 1	30.93	2	1.00	0.49	0.12	0.50	0.47	0.14
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	310.36	22	1.00	0.90	0.35	0.79	1.37	0.46
Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	28.83	2	1.00	1.19	0.46	1.35	1.78	0.65
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	332.17	23	1.00	0.98	0.34	1.06	1.42	0.53
Serpin B9	47.76	2	1.00	0.96	0.46	1.20	0.88	0.46
Signal transducing adapter molecule 2	40.86	2	1.00	0.99	0.49	0.80	1.49	0.42
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	476.45	41	1.00	1.19	0.40	1.13	1.62	0.47
U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	36.83	2	1	1.02	0.40	1.04	0.43	0.58
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	144.77	6	1	1.03	0.42	0.75	1.48	0.29
T-complex protein 1 subunit alpha	459.55	29	1.00	0.98	0.33	0.83	1.40	0.51
Thioredoxin domain-containing protein 5	238.61	22	1.00	1.11	0.45	1.09	1.96	0.95
Transcriptional regulator ATRX	42.26	3	1.00	0.68	0.19	0.86	1.15	0.41
Tyrosine-protein kinase Lyn	35.78	2	1.00	1.34	0.37	1.48	0.75	0.80
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	58.91	4	1.00	1.40	0.36	1.14	1.62	1.19
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	68.62	4	1.00	1.27	0.47	1.29	1.52	0.62

表7. タンパク質比較定量解析結果:細胞死関連タンパク質群
(アポトーシス、ネクローシス含)

Protein name	Protein Score	Peptide count	Relative reation (sample/TCPS)					
			TCPS	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
14-3-3 protein epsilon	479.47	19	1.00	1.15	0.38	1.06	1.54	0.68
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	934.58	41	1.00	1.02	0.43	0.97	1.52	0.85
78 kDa glucose-regulated protein	1302.23	71	1.00	1.19	0.39	1.00	1.84	0.67
Annexin A7	174.19	10	1.00	1.21	0.43	0.95	1.76	0.45
Astrocytic phosphoprotein PEA-15	84.78	6	1.00	1.35	0.43	1.64	1.50	0.47
Catenin beta-1	84.86	12	1.00	1.23	0.41	0.97	1.20	0.90
Desmoplakin	187.28	18	1.00	1.14	0.37	1.17	1.38	0.69
DnaJ homolog subfamily B member 1	26.82	2	1.00	1.27	0.42	1.55	2.10	0.20
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	51.35	6	1.00	1.26	0.51	1.28	1.45	0.87
Eukaryotic translation initiation factor 4E	38.15	4	1.00	1.73	0.32	1.90	1.70	0.72
Fructose-bisphosphate aldolase A	641.5	44	1.00	1.06	0.34	0.87	1.39	0.36
Glucosylceramidase	118.03	8	1.00	1.36	0.48	1.22	1.24	0.83
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	153.67	15	1.00	1.06	0.39	0.88	1.50	0.62
GTPase HRas	64.63	3	1.00	0.82	0.37	0.66	1.40	0.43
Heat shock cognate 71 kDa protein	1232.01	58	1.00	1.15	0.34	0.86	1.76	0.51
Heat shock protein 105 kDa	122.29	14	1.00	0.93	0.37	0.85	1.62	0.43
Heat shock protein HSP 90-beta	1207.37	63	1.00	1.15	0.32	0.86	1.67	0.51
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	727.43	29	1.00	1.01	0.38	0.88	1.55	0.65
Hexokinase-1	376.77	23	1.00	0.85	0.32	0.93	1.24	0.45
Histone deacetylase 1	64.81	3	1.00	1.27	0.30	1.10	1.09	0.57
Integrin-linked protein kinase	119.09	11	1.00	0.97	0.37	0.97	1.07	0.41
Interleukin enhancer-binding factor 3	160.57	19	1.00	1.19	0.34	0.97	1.38	0.48
Macrophage migration inhibitory factor	93.78	4	1.00	1.10	0.42	0.96	1.15	0.31
Peroxiredoxin-2	113.4	7	1.00	1.06	0.47	1.05	1.32	0.46
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	152.73	9	1.00	1.37	0.41	1.28	1.41	0.49
Proliferation-associated protein 2G4	162.52	13	1.00	0.96	0.34	0.89	1.42	0.41
Protein DEK	81.87	2	1.00	1.11	0.35	0.87	1.66	0.59
Protein DJ-1	234.23	12	1.00	0.79	0.30	0.81	0.90	0.24
Ras-related protein Rap-1A	217.37	9	1.00	1.21	0.46	1.46	1.32	0.85
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	39.65	2	1.00	0.82	0.36	1.07	1.26	0.62
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	164.84	13	1.00	1.08	0.45	1.09	1.44	0.37
Serine/threonine-protein kinase PAK 1	30.93	2	1.00	0.49	0.12	0.50	0.47	0.14
Src substrate cortactin	169.9	12	1.00	0.93	0.26	0.95	1.61	0.33
T-complex protein 1 subunit alpha	459.55	29	1.00	0.98	0.33	0.83	1.40	0.51
T-complex protein 1 subunit theta	456.33	26	1.00	0.99	0.35	0.83	1.34	0.47
Transcriptional regulator ATRX	42.26	3	1.00	0.68	0.19	0.86	1.15	0.41
Transforming protein RhoA	263.77	12	1.00	1.13	0.36	0.98	1.42	0.49
Tubulin alpha-1A chain	1454.63	55	1.00	0.94	0.34	0.81	1.31	0.39
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	68.62	4	1.00	1.27	0.47	1.29	1.52	0.62
Zyxin	171.98	16	1.00	0.85	0.21	0.81	1.32	0.37
14-3-3 protein theta	428.9	24	1.00	1.10	0.34	1.18	1.78	0.50
HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain	73.84	4	1.00	1.07	0.15	0.67	2.13	0.21
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	61.34	3	1.00	1.27	0.37	1.52	1.48	0.72
B-cell receptor-associated protein 31	76.87	6	1.00	1.25	0.28	1.14	1.21	0.63
Calpain-2 catalytic subunit	387.59	25	1.00	0.97	0.37	0.90	1.34	0.43
Hsp90 co-chaperone Cdc37	77.16	9	1.00	1.05	0.40	0.98	1.34	0.60
CDK5 regulatory subunit-associated protein 3	46.92	3	1.00	0.68	0.34	1.35	1.02	0.69
Cytochrome P450 1B1	40.49	2	1.00	1.38	0.21	1.54	1.69	0.41
Calcyclin-binding protein	39.23	2	1.00	0.92	0.32	0.79	1.26	0.35
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4	45.65	3	1.00	1.26	0.39	1.03	2.52	0.61
Glutaredoxin-1	70.97	2	1.00	1.00	0.45	1.02	0.95	0.14
HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain F	55.6	2	1.00	1.26	0.27	0.94	3.03	0.62
Protein disulfide-isomerase	1067.95	57	1.00	1.13	0.39	1.05	1.73	0.87
Protein disulfide-isomerase A3	876.54	45	1.00	1.00	0.38	0.96	1.84	0.67
26S protease regulatory subunit 6B	147.36	10	1.00	1.12	0.44	1.23	1.19	0.71
Serine/threonine-protein kinase SMG1	32.98	4	1.00	1.07	0.46	1.50	1.64	0.87
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	311.63	16	1.00	1.18	0.36	1.07	2.06	0.75
Tropomyosin alpha-3 chain	437.53	32	1.00	1.24	0.37	1.20	1.79	0.84
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	81.93	5	1	1.18	0.32	0.86	2.11	0.57
ATP-binding cassette sub-family E member 1	75.04	6	1	1.07	0.31	0.95	1.38	0.46
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulat	111.12	8	1	0.90	0.39	0.84	1.44	0.53
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulat	104.65	2	1	0.86	0.37	1.45	1.00	0.62
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulat	310.36	22	1	0.90	0.35	0.79	1.37	0.46

表8. タンパク質比較定量解析結果:細胞外マトリックス関連タンパク質群

Protein name	Protein Score	Peptide count	Relative reaction (sample/TCPS)					
			TCPS	PET	M100	M75H25	M50H50	M25H75
Collagen alpha-1(I) chain	780.42	60	1.00	1.22	0.24	1.03	2.12	0.67
Collagen alpha-1(III) chain	77.18	4	1.00	1.19	0.43	1.02	2.39	0.72
Collagen alpha-1(V) chain	102.94	5	1.00	0.84	0.33	0.81	1.24	0.54
Collagen alpha-1(VI) chain	662.21	40	1.00	1.27	0.39	1.17	1.61	0.75
Collagen alpha-1(XII) chain	317.21	31	1.00	1.33	0.51	1.18	2.08	0.59
Collagen alpha-2(I) chain	538.01	41	1.00	1.09	0.25	1.04	1.95	0.63
Collagen alpha-2(V) chain	27.53	2	1.00	0.36	0.17	0.46	1.08	0.23
Collagen alpha-2(VI) chain	286.19	25	1.00	1.35	0.42	1.01	1.97	0.67
Collagen alpha-3(VI) chain	2527.02	146	1.00	1.19	0.45	1.23	1.66	0.59
Fibronectin	3969.06	180	1.00	1.41	0.33	1.13	2.16	0.71
Fibronectin type III domain-containing protein 3B	103.29	4	1.00	1.09	0.41	1.23	0.81	0.87
Fibronectin type III and SPRY domain-containing protein 1	28.19	2	1.00	1.56	0.46	1.43	1.15	0.75
Fibronectin type III domain-containing protein 1	20.53	2	1.00	0.97	0.43	0.85	0.53	0.51
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	265.08	26	1.00	1.27	0.32	1.02	1.63	0.65
Kinectin	106.46	11	1.00	1.71	0.53	1.57	1.90	0.89
Fermitin family homolog 1	36.24	2	1.00	1.27	0.44	1.30	1.65	0.52
PDZ and LIM domain protein 2	98.37	2	1.00	1.02	0.34	0.91	1.52	0.37
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	145.19	5	1.00	1.40	0.64	1.44	2.08	0.73
Laminin subunit beta-1	85.4	4	1.00	1.01	0.70	1.22	2.14	1.62
Laminin subunit gamma-1	158.21	10	1.00	1.23	0.47	1.18	1.79	0.83
Periostin	37.1	2	1.00	1.17	0.37	1.47	0.51	0.73
Talin-1	1781.51	98	1.00	1.09	0.35	0.96	1.43	0.42
Talin-2	196.89	12	1.00	1.03	0.38	0.92	1.65	0.32
ATP-dependent RNA helicase A	267.99	29	1.00	1.17	0.45	1.07	1.69	0.59
Biglycan	73.49	2	1.00	1.72	0.56	1.63	2.04	0.89
C-type mannose receptor 2	214.09	19	1.00	1.47	0.58	1.75	2.09	1.38
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	80.12	5	1.00	1.32	0.41	1.10	1.34	0.46
Cartilage-associated protein	108.61	12	1.00	1.19	0.43	1.25	1.81	0.92
Glycosyltransferase 25 family member 1	60	7	1.00	1.06	0.40	1.12	1.02	0.60
Lysyl oxidase homolog 2	44.32	2	1.00	1.14	0.28	0.92	3.01	0.61
Melanoma inhibitory activity protein 3	39.12	3	1.00	1.00	0.36	1.11	1.27	0.44
Myosin-10	468.9	37	1.00	1.32	0.48	1.08	1.83	0.52
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	412.14	22	1.00	1.30	0.53	1.40	1.71	1.03
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	457.93	36	1.00	0.96	0.29	0.94	1.46	0.68
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	330.83	17	1.00	1.00	0.42	1.27	1.40	0.85
Prolyl 3-hydroxylase 1	415.1	23	1.00	1.10	0.39	1.08	1.60	0.80
Prolyl 3-hydroxylase 2	44.43	2	1.00	1.31	0.50	1.49	1.87	1.18
Prolyl 3-hydroxylase 3	112.45	7	1.00	0.88	0.39	0.75	1.54	0.45
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	387.15	26	1.00	1.29	0.41	1.18	1.93	0.61
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	454.62	26	1.00	1.17	0.40	1.01	1.53	0.92
Protein disulfide-isomerase A6	608.78	26	1.00	1.04	0.36	0.96	1.63	0.65
Serpin H1	1002.51	52	1.00	1.14	0.39	1.02	1.45	0.70
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	99.14	12	1.00	0.86	0.33	0.94	0.83	0.76
Vimentin	6083.8	125	1.00	0.82	0.28	0.73	1.27	0.49
Xaa-Pro dipeptidase	154.7	3	1.00	0.98	0.44	1.28	1.13	0.49
Arylsulfatase B	52.72	3	1.00	0.83	0.32	1.07	2.77	0.69
UDP-glucose 6-dehydrogenase	709.36	42	1.00	0.84	0.34	0.80	1.26	0.45
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	63.49	5	1.00	1.16	0.38	0.91	1.76	0.30
Prolyl 3-hydroxylase 1	415.1	23	1.00	1.10	0.39	1.08	1.60	0.80
Decorin	27.96	2	1.00	1.46	0.66	1.47	1.76	0.89
Beta-galactosidase	28.16	2	1.00	1.89	0.29	2.39	1.10	0.88
Hyaluronan synthase 1	65.72	4	1.00	1.39	0.44	1.86	1.67	0.82
CD44 antigen	262.83	13	1.00	0.87	0.27	0.77	1.39	0.58
Protein-lysine 6-oxidase	38.95	3	1.00	0.88	0.09	0.69	0.82	0.29
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2	156.68	3	1.00	1.23	0.44	1.26	1.58	0.77
Vinculin	714.23	51	1.00	1.17	0.48	1.11	1.65	0.45
Fibrillin-1	52.7	2	1.00	1.18	0.09	0.80	1.37	0.03
Integrin beta-1	434.99	26	1.00	1.16	0.35	0.97	1.84	0.81
Integrin alpha-3	53.98	2	1.00	0.78	0.25	0.84	1.01	0.47
Integrin alpha-5	123.2	9	1.00	0.98	0.31	0.80	1.45	0.53
Integrin alpha-11	130.5	4	1.00	1.83	0.25	1.45	1.96	0.81
Integrin alpha-V	138.77	11	1.00	0.99	0.51	1.52	1.70	0.93
Integrin-linked protein kinase	119.09	11	1.00	0.97	0.37	0.97	1.07	0.41

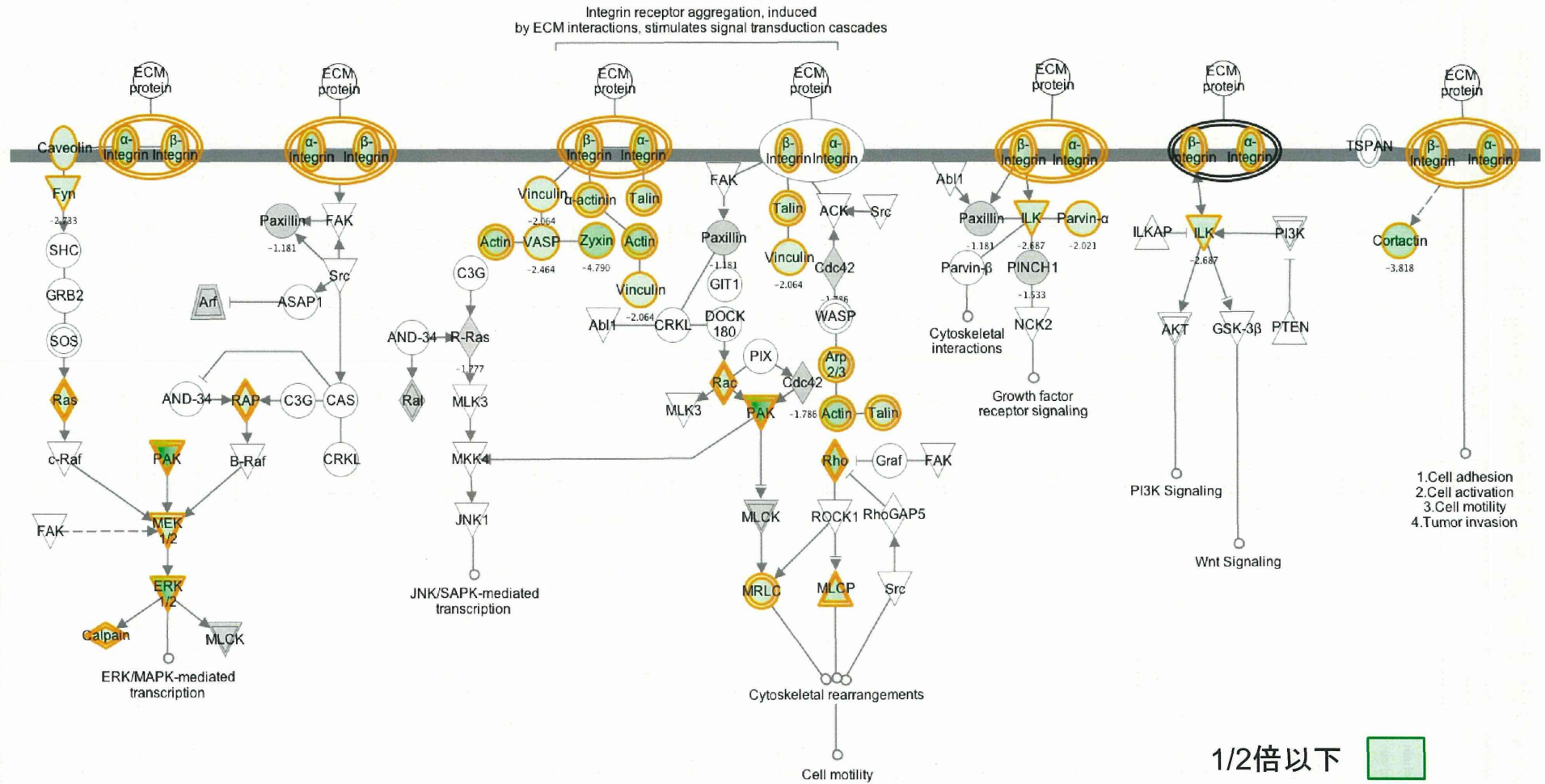


図5. インテグリンシグナルにおよぼすM100表面の影響

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
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

研究分担者 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
研究協力者 石原一彦 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 教授
研究協力者 井上祐貴 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 助教
研究協力者 京本政之 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 産学連携研究員

研究要旨

人工関節は毎年 17 万例以上が使用され、今後も使用数の増加が予想されている。同時に不具合による再置換も増加しており、人工関節の長寿命化が望まれている。人工関節の不具合の主要因は摺動面における摩耗であるため、これを改善するための新材料の開発や摺動面の親水性コーティングが行われている。

細胞膜成分類似の構造を持ち高い生体適合性を有している 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーは、人工関節の摺動面にコーティングすることにより、低摩擦化、低摩耗化に寄与することが報告されている。しかし、その詳細な作用機序や耐久性については不明な点も多い。また、今後も類似の親水性コーティング技術が応用される可能性もあることから、親水性界面を持つ摺動面の耐久性評価や摩擦係数測定などの特性評価法の開発は重要である。

昨年度までに、poly (MPC) (PMPC) コーティングを施した試料について摩擦係数測定を行ったところ、片当たりにより早期にコーティングが剥離することがわかった。そこで本年度は、片当たりしにくい試験条件を採用することにより、PMPC コーティングの摩擦測定を可能にした。その結果、PMPC では摩擦係数が 0.001 という超低摩擦を実現していることがわかった。

Polyetheretherketone (PEEK) や炭素繊維で強化した炭素繊維強化 PEEK (CFR-PEEK) は生体適合性が高く機械的特性も良好であるためインプラント材料として実用化されており、人工関節の摺動面への応用も検討されている。昨年度、これらの材料の吸水量は UHMWPE に比べ格段に多く、従来の重量変化による摩耗量評価では新材料の極めて微量の摩耗量を適切に評価することが難しいことがわかった。そこで本年度は、形状変化より摩耗量を評価する方法を開発し、これにより CFR-PEEK の極めて微量の摩耗量を評価できることを示した。

A. 研究目的

人工関節置換術は、整形外科領域で最も成

功した治療法とも言われ、主に変形性関節症

や関節リウマチの患者で、痛みなどの理由に

より歩行や起立といった日常生活に支障が生じた場合に使用される。2010年には年間約17万例[1]が使用されていると推計されており、今後も高齢人口の増加などを背景に、症例数の増加が予想されている。

人工関節は埋植後恒久的に使用できることが望ましいが、不具合による再置換例も増加している。再置換術は、不具合を起こした人工関節を抜去する必要があるため、初回手術に比べて人工関節を支える骨の質及び量の低下もあることから、初回の手術に比べ困難な手術となる。そこで、再置換に至る不具合の生じない人工関節の開発や、人工関節の長寿命化に関する研究が盛んに行われている。人工関節の長寿命化により患者や家族の身体的および精神的、経済的な負担が解消されるだけでなく、社会経済学的にも医療費の削減など、非常に有益である。

人工関節の不具合の原因は、患者に起因するものや、手術手技に起因するものなども含め、極めて多岐にわたる[2]が、製品に起因する主な原因としては、摺動面における摩耗が挙げられる[2, 3]。この問題の解決のため、1990年代より、摺動面材料である超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)の改良などが行われてきた。近年、これに加え、新規の材料の採用や、摺動面の表面改質も行われている。

細胞膜に含まれる代表的なリン脂質である、phosphatidylcholine(PC)を構成するphosphorylcholineを含む物質である2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)を重合したMPCポリマーは、親水性が極めて高く[4]、蛋白を吸着しない[5]など優れた生体適合性を示すことが知られている。Moro et al.はpoly(MPC)(PMPC)を人工関節の摺動面に適用し、低摩擦と低摩耗を実現できることを報告した[6, 7]。また、in vivo

およびin vitroにおいて摩耗粉を模した微細な粉体を使用して実験を行い、PMPCコーティングを施した粉体は通常の粉体に比べ、マクロファージの活性化や骨溶解が抑制される[6]ことから、万一摩耗により生体内に摩耗粉として放出されても、PMPCコーティングの作用により人工関節のゆるみなどの不具合につながりにくい可能性を示した。

このような親水性ポリマーを用いた界面処理による低摩擦化、低摩耗化は、PMPC以外のポリマーでも報告されており[8]、その親水性や電荷、ポリマーブラシ構造と呼ばれる立体構造に起因していると考えられている。しかし、その詳細については不明であり、耐久性などの評価法も確立していない。そこで、本研究では親水性ポリマーブラシ構造をもつ摺動面の低摩擦、低摩耗の機構の解明と、耐久性評価法の確立を目的とした。

もう一つの低摩耗化の取り組みとして、新規の摺動面材料導入の検討も行われている。例えば、従来からあるUHMWPEや金属、セラミックスに加え、polyetheretherketone(PEEK)の研究[9, 10]も進んでおり、PMPCコーティングも可能である[11]。

新材料の摩耗特性評価は、従来のUHMWPEの評価方法に従って行われていることが多い。しかし、摩耗量が負であるとの報告が多くなっている。その一因として水分の吸収が考えられた。そこで、UHMWPE、PEEK及び炭素繊維強化PEEK(CFR-PEEK)について水分吸収量を調べたところ、PEEKやCFR-PEEKの吸水量はUHMWPEの20倍以上であることがわかり、誤差の原因となっていることが示唆された。

そこで本研究では、重量変化により摩耗量を評価していた従来の方法に代わり、形状変化により摩耗量が少ない新材料の摩耗特性を

評価することを検討した。

B. 研究方法

1. 摩擦係数の評価

摩擦係数は、摺動の状態を知る手がかりとなる、最も重要なパラメータである。摩擦係数の測定のため、二次元摩耗試験機に、摩擦係数を測定できるシステムを取り付けた(図1)。具体的には、二次元摩耗試験機の上にあるピンホルダー部分に、摺動中の摩擦力により変形する二本の薄板を取り付け、ここに一般応力測定用ゲージ(共和電業、KFG-02-120-C1-11L3M2R)を貼付した。これらのひずみゲージをセンサーインターフェース(共和電業、PCD-300B)を介してパーソナルコンピュータに接続し、専用のダイナミックデータ収録ソフトウェア(共和電業、DCS-100A)により記録した。ひずみゲージの接続法には4ゲージ法を用い、引張圧縮ひずみが相殺され、曲げひずみのみが検出されるようにした。この方法では出力は4倍となり、より感度よく計測される。キャリブレーションにより極めて高い線形性が得られることを確認している。

試験材料としてUHMWPE(GUR 1020)、PEEK(450G)、CFR-PEEK(スミプロイCK4600)を用いた。機械加工により40 mm x 40 mm x 10 mmのプレート状の試験片を作製し、PEEKとCFR-PEEKについては表面研磨を施した。

また、PEEKとCFR-PEEKの表面にPMPCコーティングを施した[11]試料(PMPC-PEEKおよびPMPC-CFR-PEEK)も用意した。

炭素繊維を含む材料の相手面に金属を使用すると、材料に含まれる炭素繊維により金属製相手面に傷がつくため、相手面にはアルミ

ナセラミック製ピンを使用した(図1)。片当たりを防ぐため、端面は半径が100 mmの半球面状とし、その表面は人工関節の骨頭と同様の鏡面仕上げとした。

荷重条件は、2 kg、5 kg、10 kg、20 kgとした。摺動パターンは長さ10 mmの単純往復動とし、摺動速度は4 mm/sであった。

潤滑液には、牛血清水溶液を用いた。ISO規格[12]を参考に、牛血清(三光純薬、Calf serum、CC3017-502、Lot No: 03111172)を蛋白量が20 g/Lとなるよう、蒸留水で希釈した。なお、今回使用した牛血清の総蛋白量は73 g/Lであった。カルシウムの沈着を抑制するためにエチレンジアミン四酢酸(EDTA、2Na、Bio-rad、161-07284 および 4Na、Sigma-Aldrich、09-1510-5) 20 mmol/Lを加えた[12]。また、微生物の繁殖を抑制するためにアジ化ナトリウム(NaN_3 、和光純薬、195-11092) 1 g/Lを添加した[13]。試験は生体内を模して37°Cで行った。

荷重を静かに加えた後、往復動を開始した。摩擦力は100 Hzで記録し、試験はおよそ5分間継続した。

PMPCコーティングを施した試料については、試験後に観察を行い、コーティングの剥離について検討した。観察には3次元測定レーザー顕微鏡(島津製作所、OLS4000)を使用し、可視光を用いたカラー像による観察を行った。

2. 摩耗量の評価

UHMWPE、PEEK、CFR-PEEKより作製した、端面の直径が6 mmのピン試料(図2)を使用し、摩耗試験を行った。摩耗量は従来の重量法と、今回提案する形状法により行った。

重量法では、試験前に試料を水中保管し、

含水量を安定化させた上で、試料の洗浄、脱水、計量を行った[14]。摩耗試験の実施後、再度同様の手順で試料の洗浄、脱水、計量を行うことで、重量の変化量から摩耗量を評価した。重量測定は電子天秤 (Mettler-Toledo、XP26、最小表示単位 1 μg) を用いた。試料の半量 (3 個) を用いて摩耗試験を行い、残り (3 個) は含水量の変動による重量変化を相殺するためのコントロール試料とした。試験を 2 回繰り返した後、試験試料とコントロール試料を入れ替えて、さらに 2 回試験を行った。

形状法では、摩耗試験に先立ち、微小硬度計 (島津製作所、DUH-211) により、PEEK 及び CFR-PEEK ピンの摺動面の中央と、中央から 2 mm の点 4 ヲ所の合計 5 ヲ所に圧痕を作製し、3 次元測定レーザー顕微鏡 (島津製作所、OLS4000) により圧痕の形状を測定した。圧痕の深さはおよそ 6 μm で、圧痕作製 13 日後に再度測定し、形状の安定性があることを確認している。摩耗試験後に再度圧痕の形状を測定し、その大きさの変化からその点の摩耗高さを算出した。さらに、5 点の摩耗高さの平均と摺動面の面積から摩耗体積を計算した。なお、UHMWPE は強い粘弾性挙動により圧痕の安定性がないと考え圧痕は作製せず、重量法でのみ評価した。なお、重量法による測定と形状法による測定は同じ試料を用いて同時に行っている。

摩耗試験は二次元摩耗試験機により行った (図 3)。試験機上部のホルダーにピン試料を取り付けた。相手面には表面を鏡面加工したアルミナプレートを用いた。表面粗さは $R_a < 0.001\mu\text{m}$ であった。196 N の静荷重を加え、10 mm x 5 mm の矩形摺動を加えた。摺動速度は 30 mm/sec で、25 万サイクル、7.5 km まで試験した。潤滑液には、20 mmol/L の

EDTA と 1 g/L のアジ化ナトリウムを添加した牛血清水溶液 (蛋白量 20 g/L) を用い、試験は 37°C で行った。

C. 研究結果

1. 摩擦係数の評価

図 4 に 1 サイクルの摩擦力の測定例 (生データ) を示す。摩擦係数の特徴は、アルミナ製プレートに対して円筒状のピン試料を摺動させた場合とほぼ同様であった。具体的には、サイクルのはじめに静止摩擦力に相当する高い摩擦力のピークが観察され、その後は動摩擦力を示すより低い値が観察された。摺動方向が逆になると、逆方向の静止摩擦力に相当する負の方向へのピークが観察され、その後同様に動摩擦力を示す値が観察された。

図 5 にコーティングを施していない、UHMWPE、PEEK、CFR-PEEK について接触応力を変化させた際の動摩擦係数の結果を示す。UHMWPE は 0.1 程度、PEEK と CFR-PEEK では 0.15~0.3 程度であり、荷重が増加するにつれて摩擦係数が下がる傾向が見られた。この結果をアルミナ製プレートに対して円筒状のピン試料を摺動させた昨年度の結果と比較すると、公称応力が 1 MPa を超える高接触応力領域の結果とよく一致していた。

次に、PMPC-PEEK の摩擦係数を図 6 に示す。実験は同一試料を用いて、2 kg、5 kg、10 kg、20 kg の順に行っている。摩擦係数は初め 0.01 以下であったものが、次第に上昇する傾向が見られた。この波形の一部を詳細に見ると (図 7)、高い摩擦係数を示すのはサイクルのうちごく一部であり、サイクル中のほとんどでは 0.001 程度の極めて低い摩擦係数を示していた (図 8)。

同じ試験片を 90° 回転させて装置に取り

付け、再度試験を行うと、同様にサイクルの一部で高い摩擦係数が、その他の領域では低い摩擦係数が観察された（図 9）。

この試験片の顕微鏡像を図 10 に示す。部分的に変色した部分が観察され、その位置は摩擦係数測定で高い摩擦係数が測定された位置と一致していた。また、摺動していない部分でも類似の変色部が観察され、コーティングのムラを起点にコーティングの剥離が広がったものと思われた。

PMPC-CFR-PEEK の摩擦係数測定結果を図 11 に示す。摩擦係数はサイクルを通じてほぼ 0.005 以下と低い値を示したが、詳細に見ると（図 12）サイクル中の摩擦係数は安定していなかった。試験後の試験片を観察すると（図 13）、摺動方向に沿って筋状の傷が見られ、高い摩擦係数が観察された位置との相関が示唆された。また、アルミナ製のピンの表面では、カーボンと思われる付着物が観察された（図 14）。筋状の傷との関連性が考えられたが、今回の実験では因果関係の確証は得られなかった。

2. 摩耗量の評価

図 15 に摩耗試験後の CFR-PEEK ピンのマクロ写真、摩耗試験前後の圧痕の顕微鏡像を示す。マクロ写真から、片当たりにより端面の一部のみが摩耗した様子が観察されるが、圧痕の顕微鏡像でもこれが確認された。

図 16 に重量法で得られた比摩耗量を示す。PEEK の摩耗量は UHMWPE の 30 倍以上であり、形状法では作製した圧痕が摩耗により完全に消失したため評価できなかった。一方、CFR-PEEK の摩耗量は UHMWPE の約 1/75 であった。

図 17 に CFR-PEEK の比摩耗量について、形状法から得られた結果と重量法から得られ

た結果を比較して示す。得られた平均値及び標準偏差に大きな差はなく、同様の結果が得られた。

D. 考察

1. 摩擦係数の評価

コーティングを施していない材料の摩擦係数は、UHMWPE で 0.1 程度、PEEK と CFR-PEEK で 0.15~0.3 程度であった。この試験結果は昨年度までに行ったアルミナ製プレートに対して円筒状のピン試料を摺動させた場合とほぼ同様であった。また、過去の文献とも一致した[13]。一方、コーティングを施した材料では、コーティングの剥離がなければ 0.001 程度という極めて低い摩擦係数を示すことがわかり、流体潤滑状態になっているものと思われた。また、この摩擦係数は、0.005~0.03 と言われている生体関節の摩擦係数[15]より低かった。ただし、生体の関節液の粘度は潤滑液より高いと思われ、それが一因と考えられる。

しかし、摺動を繰り返すうちに摩擦係数が上昇し、顕微鏡像でも摺動部における変色が見られ、コーティングの剥離が考えられた。一方、UHMWPE に PMPC コーティングを施した材料では、股関節シミュレータによる長期の摺動試験を行っても低摩耗を維持している[7]ことから、コーティングの剥離が生じていないことが示唆される。このような剥離の有無の差は、基材の化学的な違いに起因するコーティングの接着力の差である可能性もあるが、基材の力学的な特性の差が主な原因ではないかと考えている。

表 1 に今回使用した材料及び参考としてチタン合金の主な材料物性を示す。PEEK や CFR-PEEK は UHMWPE に比べ高い弾性率をもつことがわかる。

マクロレベルではヘルツの接触理論により接触応力を求められる。半球面状のアルミナ製ピンを用いた場合の最大接触応力を表2に示す。UHMWPEでは7~16 MPa、PEEKでは18~43 MPa、CFR-PEEKでは47~111 MPaであった。なお、公称接触応力の計算においては、試験機についているカウンターウエイトによる荷重の増減を加味している。この結果から、最大接触応力は加える垂直荷重より試料の弾性率の影響を大きく受けることがわかる。

一方、ミクロレベルでは局所的に二面の突起が接触すると考えられており、その際の接触応力は硬度が低い方の材料の塑性流動応力（降伏圧力）になる[16]。ここで、引張における降伏応力を用いて近似的に考察すると、PEEKやCFR-PEEKの降伏圧力はUHMWPEに比べ格段に高いと考えられる（表1）。

以上の考察から、UHMWPEにおいて接触応力が20 MPaを超えることは考えにくいのに対して、PEEKやCFR-PEEKでは、これを大きく上回る接触応力が発生していることが予想され、コーティングの剥離などの原因になった可能性がある。

2. 摩耗量の評価

CFR-PEEKの比摩耗量は、UHMWPEの1/75と非常に小さいことがわかった。

重量法と形状法で得られた比摩耗量の平均及び標準偏差（図17）では差は見られなかったが、重量法では摩耗量がマイナスになる試料もあった。使用した天秤の最小分解能が1 µgであるのに対し、摩耗による平均重量減少量は24 µgであり、天秤による重量測定の精度の限界にも近いと思われる。また、今回使用した試料は12ヶ月以上の長期にわたり水

中にて保管されていたものであるにもかかわらず、コントロール試料の含水量の変化による重量変化は平均53 µgであった。このような長期の浸漬が実用的でない実際の摩耗量評価では、含水量の変化がさらに顕著になり、摩耗量測定に影響を与えると思われる。

今回の試験の結果、形状法では少なくとも重量法と同等以上の精度で微小な摩耗量を評価できることがわかった。片当たりが生じたため、形状法のために作製した圧痕の一部の地点では摩耗が発生せず、結果的に摩耗量の計算には用いられなかった。圧痕の数を増やすことなどにより、形状法の精度をさらに向上させることが可能と考えられる。

形状法では、試験前の含水量の安定化や、試料の洗浄、脱水の行程が不要になるため、含水量のコントロールや洗浄が難しい親水性コーティングを施した試料の摩耗量を重量法より高い精度で評価できる可能性が示された。

E. 結論

二次元摩耗試験機を改造し構築した摩擦測定システムにより、PMPCコーティングを施した、PMPC-PEEK、PMPC-CFR-PEEKの摩擦係数を測定した。その結果、PMPCコーティングを施した試料の摩擦係数は0.001程度の極めて低い値を示すことがわかった。しかし、摺動に従い摩擦係数が上昇し、コーティングの剥離が示唆された。基材となったPEEKやCFR-PEEKの弾性率や降伏応力はUHMWPEに比べ高く、摺動面において高い接触応力が発生することが考えられ、そのためコーティングに損傷が生じたものと考えられた。

CFR-PEEKの摩耗量を従来からある重量法と、新規に提案した形状法により評価した。その結果、形状法では少なくとも重量法と同