

表12. PHEMA上で培養したTHP-1の遺伝子発現の有意な変化により、有意に変化した毒性関連機能

Diseases or Functions Annotation	Category	p-Value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules	No. of Molecules
hypoplasia of liver	Liver Hypoplasia	6.08E-03	Increased	2.619	ARF6,CDK2,CDK6,EPOR,LHX2,SMAD2,SPTBN1	7
cell death of liver	Liver Necrosis/Cell Death	6.41E-02	Increased	2.167	ABL2,AKT1,APP,ARF6,CBS,CCR2,CFLAR,DICER1,EPO R,FLNA,FOXO3,IKBKG,IKZF1,IRF5,PPARA,SPTBN1,STAT1,STK4,TIMP3	19
necrosis of liver	Liver Necrosis/Cell Death	9.78E-02	Increased	2.167	ABL2,AKT1,ARF6,CBS,CCR2,CFLAR,DICER1,EPOR,FLNA,FOXO3,IKBKG,IKZF1,IRF5,PPARA,SPTBN1,STAT1,STK4,TIMP3	18
inflammation of liver	Liver Inflammation/Hepatitis	1.06E-01	Increased	3.121	CBS,CCR2,CD44,DRD2,GABBR2,IKBKG,IL8,PDE7A,PLAU,PLAUR,PNPLA3,POLB,PPARA,PPP3R1,SPP1,STAT1,TIMP3,TK1	18
ventricular septal defect	Congenital Heart Anomaly	2.59E-01	Increased	2.646	ADAM17,AIP,CCNE2,CDK2,FLNA,PHC1,SRSF10	7
congenital heart disease	Congenital Heart Anomaly	4.05E-01	Increased	2.599	ADAM17,AIP,CCNE2,CDK2,DSG2,FLNA,PHC1,SMAD2,SRSF10,STK4	10
cell death of kidney cell lines	Renal Necrosis/Cell Death	1.19E-03	Decreased	-2.326	AKT1,APP,ATF6,BCL2A1,BRCA2,CASP2,CD44,CFLAR,CTNNB1,CUL4B,EMP2,EMP3,EZR,GAPDH,IKBKG,ITGB1,ITPR1,MST4,NF2,PAK1,PAK2,PPARD,PPP3R1,PRKDC,RNF216,SDHC,SPP1,STK4,TCF4,TFRC,TMX1	31
cell death of kidney cells	Renal Necrosis/Cell Death	3.76E-03	Decreased	-2.747	AKT1,APP,ATF6,BCL2A1,BRCA2,CASP2,CD44,CDK2,CFLAR,CTNNB1,CUL4B,EMP2,EMP3,EZR,GAPDH,IKBKG,ITGB1,ITPR1,MST4,NF2,PAK1,PAK2,PPARD,PPP3R1,PRKDC,PRKDC,RNF216,SDHC,SPP1,STK4,TCF4,TFRC,TMX1	33

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
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

研究分担者	植松美幸	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
研究協力者	齋島由二	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
研究協力者	中岡竜介	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
研究協力者	瀬川勝智	国立医薬品食品衛生研究所	医薬安全科学部
研究協力者	中野達也	国立医薬品食品衛生研究所	医薬安全科学部

研究要旨

本年度は、中間水が存在する材料のひとつとされるPoly(2-methoxyethyl acrylate)を対象とし、材料表面近傍における水の存在について、分子動力学的シミュレーションの結果から検討した。前年度のNMR解析、水の吸着エネルギーを考慮したシミュレーション結果から、メキシ基の酸素原子の近くに存在する水が中間水である可能性が示唆されている。今回のシミュレーション結果から、メキシ基周りの水の距離に応じた個数とその水の拡散係数を算出することで、中間水の動きやすさの数値化を試みた。50重合体のPoly(2-methoxyethyl acrylate)に対して100個の水を配置させ、セル内のエネルギーが安定した状態の400フレーム分の解析を行ったが、中間水とバルク水との差異を示す値を得られなかった。また、フレーム間の解析では、メキシ基周辺にとどまる水が存在するが、バルク水と交換していくように観測された。これがシミュレーションで見ることのできる中間水ではないかと考えられた。

A. 研究目的

平成22年度より、生体適合性評価の結果を迅速に得る上での補完的役割として、指標の一部にシミュレーションを組み込むことを想定した研究を行ってきた。高分子をコンピュータ上で構築し厳密な計算を行うことは、現在の技術では難しいため、モノマー・オリゴマー単位での計算に情報を削減するが、これから現実世界を予測できればと考えている。そこで示し得ることと、難しいこととの境界を探りたいと考えている。

そのモチベーションとして、体内に埋込む医療機器は生体への高い適合性が求められることが背景にある。新規材料に対して、長期的な埋込みによる生体適合性の評価をすることを考えると、実際の応用までに時間を要す

るが、材料開発段階でその予測ができれば、材料をより迅速に患者へ普及させることができると考える。その評価指標のひとつとして、本研究ではコンピュータシミュレーションによる評価指標の開発に取り組んできた^{[1]-[3]}。

高分子中の水は大きくわけて不凍水、中間水、自由水の3種類ある^[4]。これまで進めてきた中で一貫して採用してきた仮定は、新規材料を構築する上で、シミュレーションによる中間水の存在の確認を、血液適合性評価のひとつのツールにするということである。そのために、中間水はどのようにシミュレーション上で表現するのかについて論じてきた。これは、生体/材料界面における水分子の構造が生体適合性に大きな役割を果たすという考えに基づく。田中らのグループによって実験

的に中間水の存在することが確認されている材料は血液適合性がよいものであることが示されている^[5]。また、生体/材料界面における水分子の構造については、他にも実験によって確認されている^{[6]-[8]}。中間水の材料開発後に多くの試験を求められるのではなく、材料開発中に試行錯誤する上での参考としても役立つと考えている。

研究の目的は医用高分子表面近傍の水和状態に着目し、分子動力学シミュレーションによって中間水の存在可能性を示すことである。これまで創薬用のシミュレーションソフトウェアであるDiscovery Studio (Accelrys社)を用いたシミュレーションから始め^[1-2]、平成24年度には材料シミュレーション用に特化したMaterials Studio (Accelrys社)に変更し、水分子の吸着エネルギーや拡散係数、動径分布関数などによる解析手法を検討してきた。また、実験値としてNMRでの解析を行った。これにより、PMEA: Poly(2-methoxyethyl acrylate)中に中間水の存在がありそうであると予測され、その位置がメトキシ基周辺であると考えられた^[3]。

本年度の目的は、PMEA中に存在する高分子の位置と動きを数値化することである。そこで、Pipeline PilotによるプロトコルとPerlを用いた自作プログラムによって結果の解析を行い、中間水とバルク水の数値による分類を試みた。

B. 方法

1. 使用したシステム

Materials Studio (Accelrys社)の下記モジュール群を用いて行った。

- Visualizer: 立体構造の表示
- Conformers: 最適構造の探索
- Compass: 力場計算
- Forcite Plus: 分子動力学計算
- Adsorption Locator: 吸着エネルギー計算

2. 初期構造の決定と分子動力学計算

現実世界で存在する構造の状態を見ることは難しいが、計算上安定的な構造を与えるためにConformersを用いた構造決定を行った。力場はCOMPASSを用いた。

- 1) 3D Atomistic Document上でモノメトリックな構造を作成し、Repeat Unit設定のためにHeadとTailを指定する。Conformers Calculationを利用し、構造の探索を行い、エネルギーが最小となる構造をmonomerとして登録する。(図1: MEAのモノメトリックな構造。(a)分子構造式、(b)エネルギー最小となる構造)。
- 2) Build PolymersのHomopolymerを利用し、登録したmonomerをもとにisotacticとsyndiotacticの50量体の構造を作成する。これをConformerにて構造探索を行い、エネルギーが最小となる構造を初期構造とする(図2: isotactic、図3: syndiotactic。(a)は一部を拡大した図、(b)は全体を示した図)。
- 3) Amorphous Cellを用いて、周期性をもつCell構造を作成する。重合数は50のPMEAに対して、100個の水分子を与えたCell構造を作成する。密度が 1.22g/cm^3 に対して、1辺 23.06\AA となった(図4)。
- 4) Forcite Plusを用いて、Annealingを300Kから500Kで5サイクル行い、Dynamicsを行った。ここでDynamicsはNVTで50,000ステップ(50ps)、NVEで100,000ステップ(100ps)行った。

上記1-4の流れでisotactic、syndiotacticともに5サンプルずつ試行した。

3. シミュレーション結果の解析

以下の解析はMaterials Studioに付属するPipeline Pilotを介して、MaterialsScript APIを利用し、自作のPerlのプログラムを併用しながら行った。

(1) メトキシ基周りの水の個数

メトキシ基周りに中間水が存在するという仮定のもと、メトキシ基の酸素原子から 1\AA ごとの距離に応じて存在する水の個数を算出した(図5: Pipeline Pilotでのプロトコル)。

(2) メトキシ基からの距離に応じた水の動き

1番目のフレームを取り出し、メトキシ基の酸素原子からの距離に応じて、 1\AA ごとに範囲を設定し、その中に入る水分子について、

メトキシ基に対する水の相対速度を算出した (図 6 : Pipeline Pilot でのプロトコル)。

また、各フレームの結果で得られた原子の位置を静止画として取込み、間をつなぐことで動画としても見るができる。これにより、視覚的にメトキシ基の酸素原子周りの水の振る舞いを観察した。

C. 実験結果と考察

(1) メトキシ基周りの水の個数と立体規則性による違い

結果を図 7 に示す。横軸はメトキシ基の酸素原子からの距離を 4Å以下、4-5Å、5-6Å、6-7 Å、7-8Åでの領域分けしたものであり、縦軸はその領域に存在する水分子の個数である。(a) は isotactic の結果、(b) は syndiotactic の結果である。いずれも 5 回の試行で似通った結果もあれば、異なる結果もあった。平均した結果での比較を行うにはサンプル数が十分でないと考え、isotactic のときの水分子の数よりも syndiotactic のときの水分子の数の方が相対的に多いと見受けられる。

この差は図 2 で見られたように isotactic の場合は側鎖が片側に偏って存在しているが、syndiotactic の場合は側鎖がほぼ 180° の向きに交互に存在していることから、メトキシ基も Cell 内でより広がって存在していることによると考えられる。Cell 内に水分子との距離を計測したときに近くに存在する数が多かったということと思われた。

一方で、水分子の平均 2 乗距離変位が時間に対して線形となっている部分を取り出し、Cell 内全体の水分子についての拡散係数を計算し、5 試行数分で平均してみると、isotactic が 6.7×10^{-6} [cm²/s]、syndiotactic が 6.8×10^{-6} [cm²/s]となった。ただし、取り出す時間幅などによっても結果が異なることに注意は必要である。より多くの試行数で傾向を見ていく必要があるとは思いますが、現在の結果を見ると、水分子全体の動きとしては isotactic と syndiotactic に大きな差異はないと思われる。中間水の振る舞いということ considering 上で、中間水的な振る舞いをする水がバルク水的な

振る舞いをする水に埋もれてしまうためである。したがって、立体規則性の違いをこのシミュレーションの結果から導くのは難しそうである。

(2) メトキシ基からの距離に応じた水の動き
100ps のデータに対して解析をしたところ、近い距離にあっても、離れた距離にあっても水分子の平均的な速度に違いはなかった。

今回、解析前には中間水というのはメトキシ基に対してほぼ固定で大きく外れることなくとどまり続ける水であると考えていた。そのため、酸素原子間の同程度距離関係ある水分子は同じように振る舞うと考え、メトキシ基側の酸素原子からの 1Å毎に区切られた範囲での水分子全体をひとまとまりで考えるアルゴリズムを用いた。

しかしながら、動画で見ると、水がメトキシ基の近くに存在しているのを確認することができる (図 8 (a))。とはいえ、この水が中間水と思われる水であるとして、他のバルク水とは異なる動きをしているとは今回の解析結果から示すことができない。また、この水についても、必ずしも同じ場所にとどまっているわけではなく、時間経過に伴う動きでメトキシ基との位置も変わっていくようであった (図 8 (b))。官能基に対する水のつながりが緩やかである中間水はその表面近くに存在するものの、ついたり、離れたたりするものであり、その振る舞いを数値として示すには今回のアルゴリズムでは十分といえなかった。

(3) アルゴリズム改正案
<メトキシ基からの範囲設定>

Trajectory を解析する上で、今回は最初のフレームでメトキシ基の酸素原子からの距離に応じた範囲を設定し、全フレームにおいて使用した。しかしながら、オリゴマーに動きがあり、水分子にも動きがあるため、その初期位置の設定には改良を要する。改良案では、解析する全フレームに対して、メトキシ基、水それぞれの酸素原子の平均値を計算し、その位置を基準として各原子間の距離を算出するものとした。

<メトキシ基に対する水の捕捉時間の考慮>

メトキシ基に対して水が同じ位置にとどまっているとは限らず、離れていくことも考慮する必要がある。中間水らしい水というものがどれぐらいの時間 (fs のオーダーとなる) メトキシ基周りに捕捉されており、それがどれぐらいの相対速度であるのかを計算する方がよいのではないかと考えている。

D. 結論

医用高分子表面近傍の水和状態に着目し、分子動力的シミュレーションを行った。

PMEA を対象とし、これまでの実験、シミュレーションによって予測されたメトキシ基の酸素原子近傍の水分子の振る舞いについて、解析した。中間水、バルク水の数値化のために、自作のプログラムにより距離に応じた平均移動変位、拡散係数を算出したが、中間水とバルク水との差異を示すには十分な解析でなかった。

中間水の振る舞いを捉えるために、全フレームの統計的な解析ではなく、官能基に捕捉された時間を見ていくことも考えていきたい。

E. 参考文献

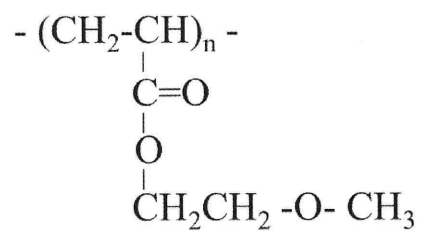
- (1) 植松美幸, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 平成 22 年度 総括・分担研究報告書 95-103 2011 年
- (2) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書 103-110 2012 年
- (3) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也: 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 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 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 24 年度 総括・分担研究報告書 151-168 2013 年
- (4) Jhon, M. S.; Andrade, J. D. J. Biomed.

Mater. Res. 7, 509 (1973).

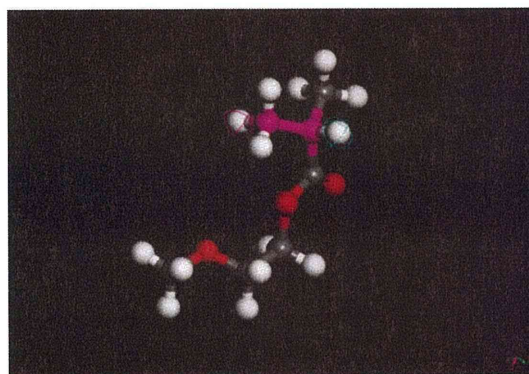
- (5) M. Tanaka et al. Polym. Int. 49, 1709 (2000).
- (6) S. Morita, M. Tanaka, Y. Ozaki, Langmuir, 23, 3750 (2007).
- (7) G. F. Li et al., J. Am. Chem. Soc., 126, 12198(2004).
- (8) Y. Miwa et al., Polymer, 50, 6091(2009).

F. 業績

- (1) Uematsu, M., Haishima, Y., Nakaoka, R., Niimi, S., Segawa, K., Nakano, T.: A Novel Evaluation Methodology of Materials for Medical Devices Based on Molecular Dynamics Simulation, 15th International Conference on Biomedical Engineering, December 2013, Singapore
- (2) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 瀬川勝智, 中野達也: 血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 (2013.11) (東京)
- (3) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 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 2 報), 高分子学会医用高分子シンポジウム講演要旨集 42nd 2013 年 7 月, 東京

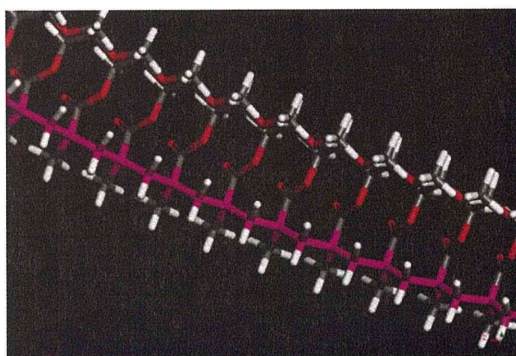


(a) 分子構造式

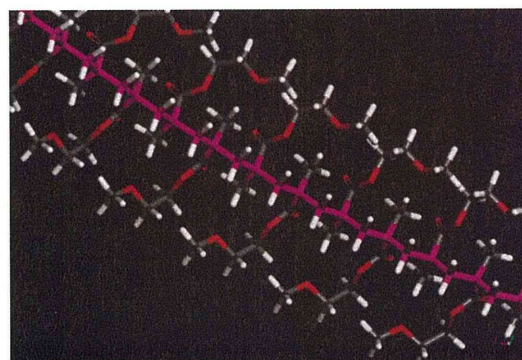


(b) エネルギー最小となる構造
(Conformer を用いた結果)

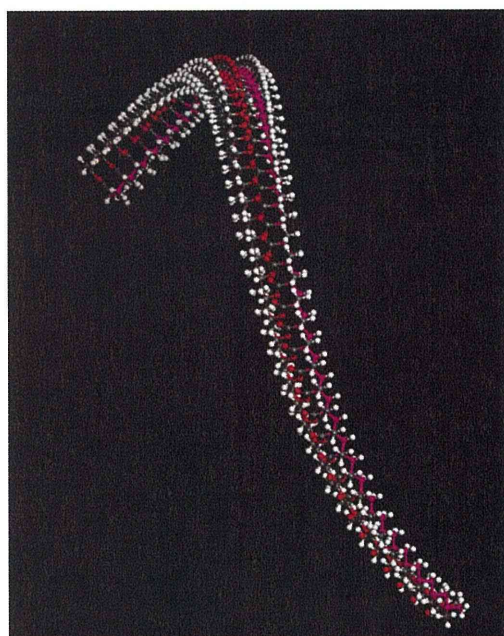
図 1 MEA (モノメトリックな構造)



(a) 拡大図

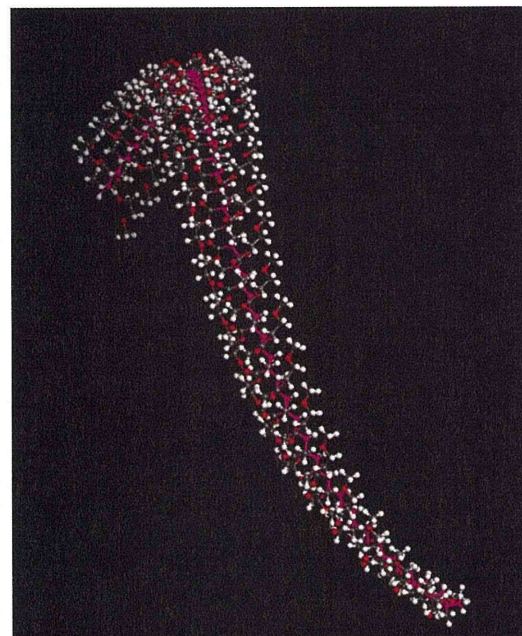


(a) 拡大図



(b) 全体図

図 2 PMEA (50 量体) isotactic



(b) 全体図

図 3 PMEA (50 量体) syndiotactic

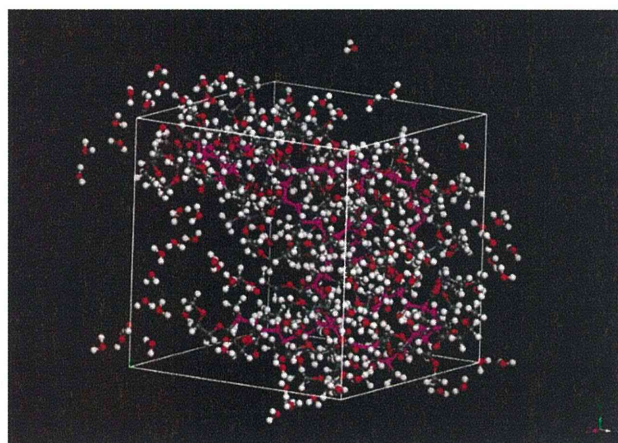


図 4 Cell 内に配置した PME (50 量体) 1 分子と水 100 分子
(Amorphous Cell による構造の作成結果)

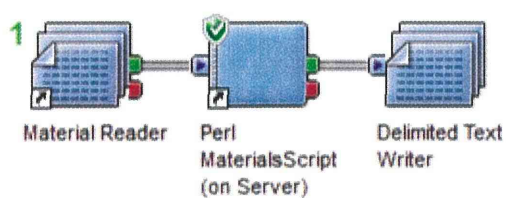


図 5 メトキシ基の酸素原子周りの水の個数の算出
(Pipeline Pilot によるプロトコル)

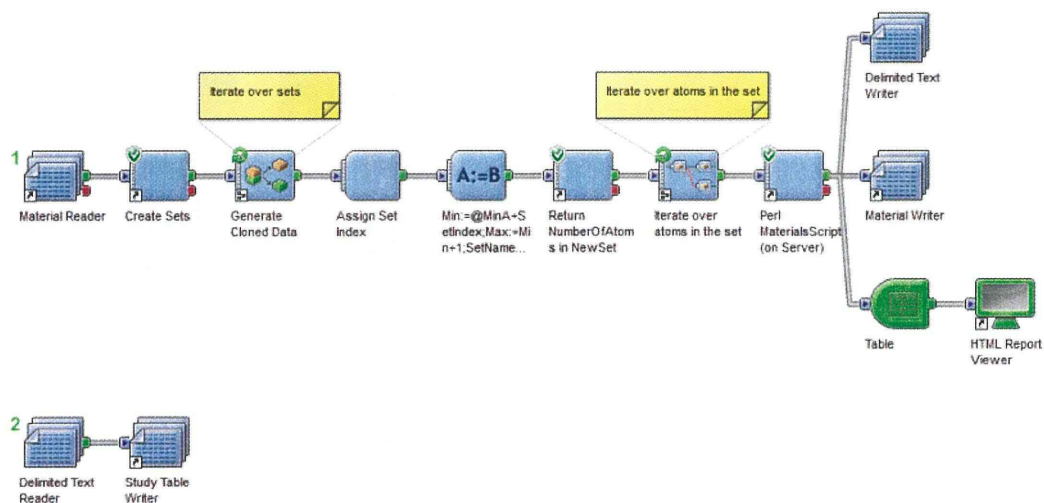
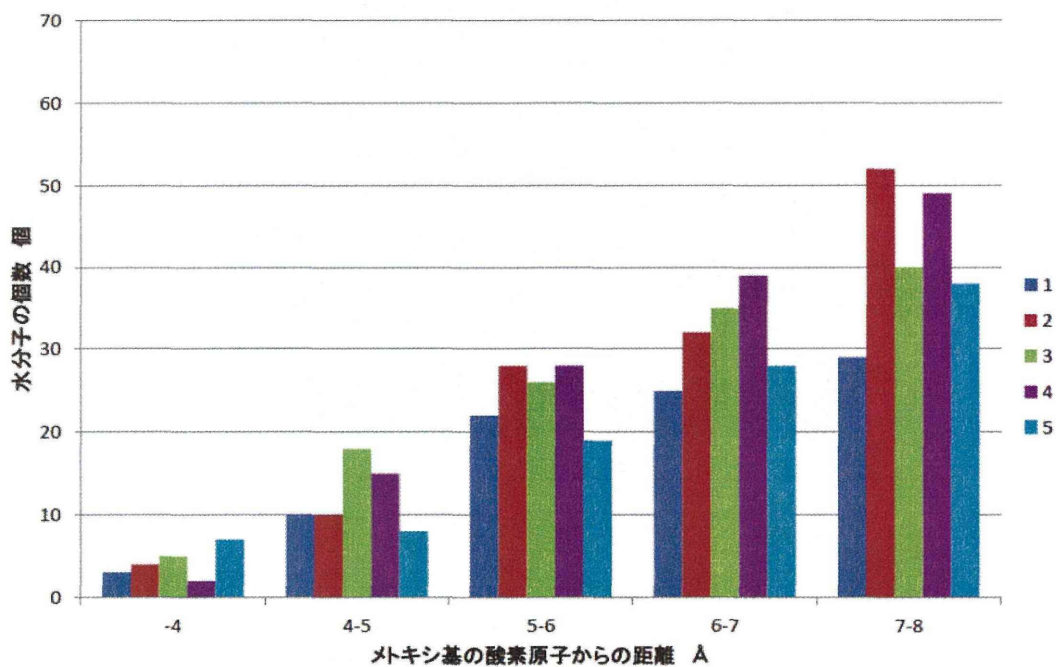
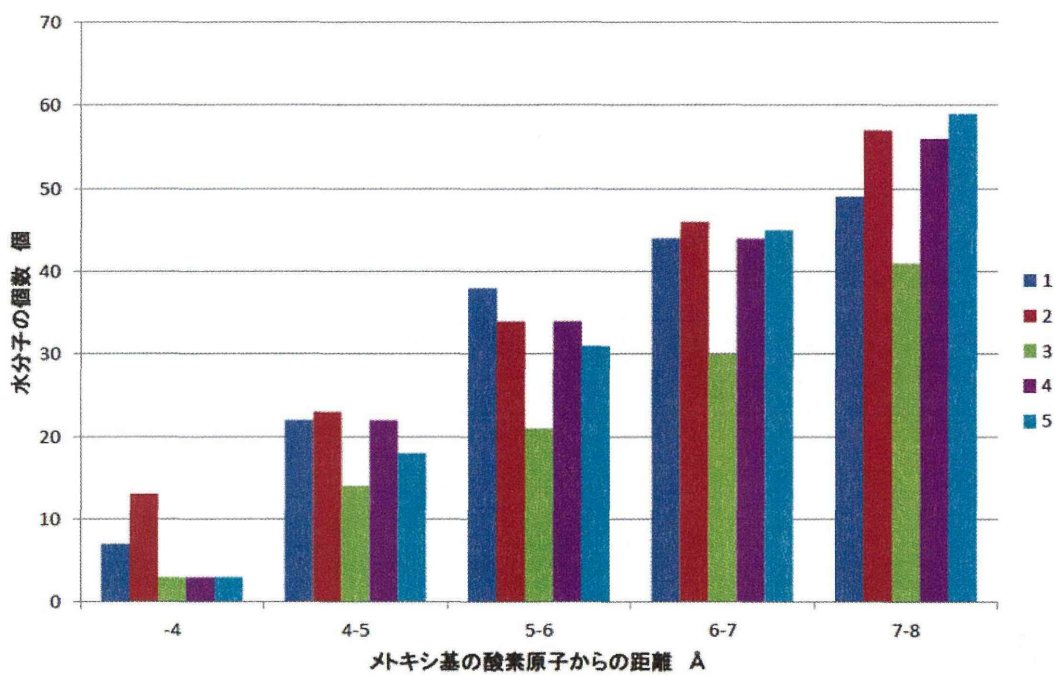


図 6 メトキシ基の酸素原子に対する水分子の相対速度の算出
(Pipeline Pilot によるプロトコル)

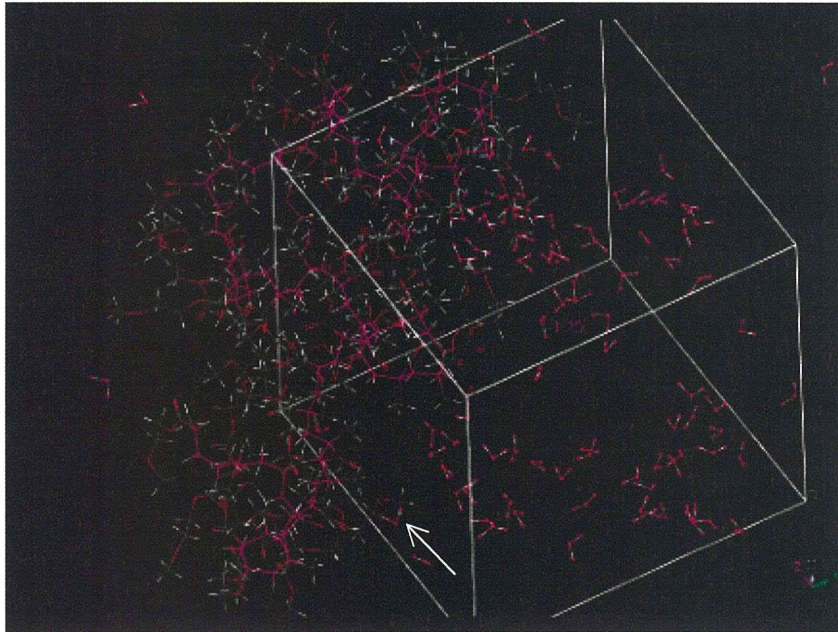


(a) isotactic の結果

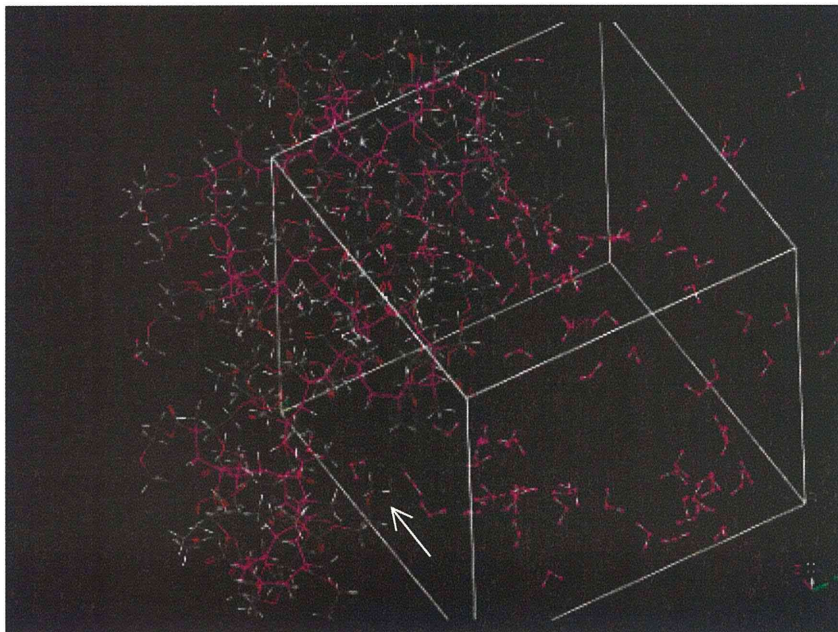


(b) syndiotactic の結果

図7 メトキシ基の酸素原子からの距離に応じた水分子の個数



(a) メトキシ基の酸素原子の近くに水分子が存在していると見られるフレーム
矢印部の水が接近している



(b) メトキシ基の酸素原子から水分子が離れていった後のフレーム
PMEA、水分子ともに動きその位置関係が変わっていく

図 8 Cell 内の PMEAs (50 量体) と水分子 100 個の位置関係
フレーム切り出しの結果

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
タンパク質吸着の動力学的解析

研究分担者 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
研究協力者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第四室長

研究要旨：血液適合性ポリマー等に対する血液適合性評価マーカー候補タンパク質の吸着挙動を動力学的に解析するため、電極表面が poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)、poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) 並びに組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体 (PHM7525、PHM5050 及び PHM2575) でコーティングされた水晶発振子マイクロバランス (QCM) センサーを作製した。QCM 法により、これらのポリマー表面に対するアルブミン、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの吸着に伴う平衡定数及び速度定数を求めた。その結果、アルブミンは結合定数が小さく、被験ポリマー表面に最も吸着しにくく、材料間で吸着挙動に差は認められなかった。フィブリノーゲンは結合定数が大きく、被験ポリマー表面に最も吸着しやすく、材料間では MEA 比率の増加に伴って解離速度定数が増加し、結合定数が低下する傾向が認められた。フィブロネクチンは解離速度定数が大きく、被験ポリマー表面に吸着したフィブロネクチンは速やかに脱着すると考えられ、材料間で吸着挙動に顕著な差は認められなかった。ポリマーコートセンサーを用いた QCM 法によって、血液適合性ポリマー等に対するアルブミン、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの吸着挙動を動力学的に解析することができた。

A. 研究目的

医用材料の界面特性のひとつであるタンパク質吸着は、その材料が持つ血液適合性に関与することが知られている¹。そのため、材料に選択的に吸着する又は吸着しないタンパク質を指標として、その材料の血液適合性を評価したり、予測したりすることが可能であると考えられている。そこで、血液適合性を有する高分子材料に吸着する血漿タンパク質の

網羅的比較定量解析から、タンパク質の吸着量を指標として数種類の血漿タンパク質が血液適合性評価マーカーの候補として挙げられた^{2,3}。しかし、タンパク質の吸着現象を議論するに当たり、平衡状態における吸着量（平衡定数）のみでは不十分であり、タンパク質の吸着速度（速度定数）に関する情報の補足が求められている。

水晶振動子は、水晶の結晶を極薄い板状に

切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をしたもので、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加すると、ある一定の周波数（共振周波数）で振動する。この時、この金属薄膜上にナノグラムオーダーの物質が吸着すると、その質量に比例して共振周波数が減少するという性質がある。この性質を利用して、金属薄膜上の微量な質量変化を計測することができる。このような方法論は、水晶発振子マイクロバランス（Quartz Crystal Microbalance; QCM）と呼ばれている^{4,5}。さらに、QCM法は、金属薄膜表面への物質の吸脱着をリアルタイムでモニタリングできるため、平衡状態にある物質の吸・脱着量のみならず、吸・脱着速度に関する情報も得ることができるという特長がある^{4,5}。したがって、予め金属薄膜を高分子材料でコーティングすれば、その材料に吸脱着する物質の質量をリアルタイムで測定することができるため、材料に吸脱着する物質の平衡定数及び速度定数を求めることが可能になる。

そこで、金電極表面を血液適合性ポリマー等でコーティングしたQCMセンサーを作製し、ポリマー表面に対する血液適合性評価マーカー候補タンパク質の吸着挙動を動力的に解析する手法を検討した。

B. 研究方法

1. 試験材料

タンパク質吸着を評価する対象のポリマーとして、poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)、poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) 並びに組成比の異なるHEMA/MEAランダム共重合体 (HEMA/MEA=75/25; PHM7525、50/50; PHM5050 及び 25/75; PHM2575) を用いた（いずれも山形大学大学院理工学研究科・田中賢教授提供）。PHEMA 及び PMEA の化学

構造を図1に、各被験ポリマーの組成比及び分子量を表1に示した^{1,6}。

また、吸着挙動を解析するタンパク質として、アルブミン（ヒト血清由来）、血液凝固因子のひとつであるフィブリノーゲン（ヒト血漿由来）及び内因系血液凝固活性化リガンドのひとつであるフィブロネクチン（ヒト血漿由来）を用いた（いずれもSigma-Aldrich Co. LLC）。

2. ポリマーコートQCMセンサーの作製

QCMセンサー用の金電極付き水晶板（株式会社イニシウム、図2左）をスピコーターに設置し、被験ポリマーの1w/v%メタノール溶液20 µLを滴下した。直ちに500 rpm、5 sec (Step 1) 及び2000 rpm、120 sec (Step 2) の条件でスピコートした後、室温で十分に乾燥させた。この水晶板を水晶分離型センサーセルに設置し、電極表面が被験ポリマーでコーティングされたQCMセンサーを作製した（図2右）。なお、上記条件における水晶板へのポリマーのコーティング量は、PHEMAでは29 µg/cm²、PMEAでは3.2 µg/cm²である。

3. タンパク質吸着実験

B.2で作製したポリマーコートQCMセンサーセルを分子間相互作用解析装置AFFINIX QNµ（株式会社イニシウム、図3）に設置し、センサーセルにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）490 µLを加え、セル温度及び攪拌速度をそれぞれ37°C及び600 rpmに設定し、QCMセンサーが安定するのを待った。被験タンパク質の添加は、速度定数を求めるため、異なる濃度で複数の実験を行う緩和法で行った。すなわち、PBSを加えて安定したセンサーセルに、アルブミンの400、800、1600、3200 µg/mL PBS溶液（終濃度8、16、32、

64 µg/mL) 並びにフィブリノーゲン及びフィブロネクチンの 50、100、200、400 µg/mL PBS 溶液 (終濃度 1、2、4、8 µg/mL) を 10 µL ずつ個別に添加し、水晶振動子の共振周波数を 1 sec ごとに測定した。なお、被験タンパク質の容器等への吸着を抑えるため、被験タンパク質溶液の調製及び保存等にはシリコナイズ処理されたチップ及びチューブ (株式会社アシスト) を用いた。

4. データ解析

B. 3 で測定した緩和法による被験タンパク質の添加に伴う QCM センサーグラムから、データ解析ソフトウェア AQUA Version 2.0 (株式会社イニシウム) を用いて、センサーグラムのカーブフィティングによって得られた見かけの結合速度定数 (k_{obs}) と添加したタンパク質の終濃度との (1) の関係式で表される相関によってリニアフィティングし、被験ポリマー表面に吸着するタンパク質の結合速度定数 (k_{on}) 及び解離速度定数 (k_{off}) を求めた。さらに、(2) 及び (3) の関係式から被験ポリマー表面に吸着するタンパク質の結合定数 (K_a) 及び解離定数 (K_d) を求めた⁵。

$$k_{obs} = k_{off} + k_{on} \cdot [\text{Guest}] \quad \text{----- (1)}$$

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad \text{----- (2)}$$

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad \text{----- (3)}$$

C. 研究結果

PHEMA 及び PMEА 表面に吸着するアルブミン、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの各濃度における QCM センサーグラムを図 4 に示した。いずれの材料及びタンパク質の組

み合わせにおいても、濃度の増加に伴ってタンパク質吸着量は増加した。これらのセンサーグラムから速度論的解析によって得られた

(1) の関係式で表される相関を図 5 に示した。さらに、(1)、(2) 及び (3) 式から算出された被験ポリマー表面に吸着するアルブミン、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの結合定数 (K_a)、解離定数 (K_d)、結合速度定数 (k_{on}) 及び解離速度定数 (k_{off}) を表 2~4 に示した。

アルブミンの結合定数及び解離定数は、材料間で差が認められなかった (表 2)。また、アルブミンの結合定数は、3 種類のタンパク質の中で最も小さかった。

フィブリノーゲンの結合定数は、PHEMA に比べて PMEА が低く、ランダム共重合体においては MEА 比率の増加に伴って低下する傾向が認められた。また、MEА 比率の増加に伴って結合速度定数が低下し、解離速度定数が増加したが、結合速度定数の変化に比べて、解離速度定数の変化の方が大きく、PMEА 表面におけるフィブリノーゲンの結合定数の低下は、解離速度定数の増加が寄与していた (表 3)。また、フィブリノーゲンの結合定数は、3 種類のタンパク質の中で最も大きかったが、結合速度定数の値が寄与していた。

フィブロネクチンの結合定数も、PHEMA に比べて PMEА が低かったが、フィブリノーゲンほど顕著な差は認められなかった。また、フィブリノーゲンとは異なり、PHEMA 及び PMEА 表面における解離速度定数の変化に比べて、結合速度定数の変化の方が大きく、PMEА 表面におけるフィブロネクチンの結合定数の低下は、結合速度定数の低下が寄与していた (表 4)。また、アルブミン及びフィブリノーゲンに比べて、解離速度定数が大きかった。

D. 考察

結合定数及び解離定数は相互作用に関する平衡定数である。すなわち、相互作用が進行して反応物（この場合、ポリマー表面に吸着していないタンパク質）が生成物（ポリマー表面に吸着したタンパク質）になる速度と生成物が反応物に解離する速度が同じになり、巨視的にみて反応物と生成物の濃度の変化が無くなった（タンパク質の吸着量が安定した）平衡状態に関するパラメータである。結合定数が大きいほど相互作用が強く、小さいほど相互作用が弱くなる。逆に解離定数は相互作用が強いほど小さく、相互作用が弱いほど大きくなる。しかしながら、これらのパラメータから反応（吸脱着）速度に関する議論は出来ず、速度に関して議論するためには、速度定数である結合速度定数及び解離速度定数を算出する必要がある。

今回の測定に用いた QCM センサーで使用している 27 MHz の基本振動数を持つ水晶振動子の場合、0.62 ng/cm² のセンサー表面上の質量増加によって、振動数が 1 Hz 減少する。したがって、センサーの振動数変化を 1 Hz 単位で計測すれば、センサー表面に吸脱着する物質の質量をナノグラムオーダーで測定することができる^{4,5}。さらに、QCM センサーの振動数はリアルタイムで計測できるため、平衡定数である結合定数及び解離定数のみならず、速度定数である結合速度定数及び解離速度定数を求めることができる。そのため、QCM 法は、物質の吸脱着過程を動力学的に解析するための有用な手法のひとつである^{4,5}。

高分子材料等に存在する水分子は不凍水、中間水及び自由水（バルク水）に分類される。不凍水は高分子との強い相互作用により冷却しても凍結しない水分子であり、自由水は 0°C で凍結するが高分子と弱い相互作用をしている水分子である。一方、中間水は昇温過程で

0°C より低温で凍結する水分子で、高分子又は不凍水と中間的な相互作用をしている。この中間水が存在する高分子材料は高い血液適合性を持つことが示唆されている¹。

PMEA は中間水を有する代表的な高分子材料であり、血漿タンパク質の吸着及び変性が少なく、血液適合性に優れた医用高分子材料である。有機溶媒への易溶解性、非水溶性、透明性及び粘着性があることから様々な基材にコーティングされ、血液適合性が要求される医療機器に応用されている。一方、PHEMA もタンパク質吸着が比較的少なく、コンタクトレンズを始めとした医療機器に利用されているが、中間水は持たず、PMEA に比べて血液適合性に劣る。

高分子材料表面に吸着するタンパク質の網羅的比較定量解析から、材料の血液適合性を評価するためのマーカータンパク質の候補が選定された^{2,3}。すなわち、対照材料としたポリビニルピロリドン（PVP）含有ポリスルホン（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）、未処理ポリスチレン（PS）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）及び超高分子ポリエチレン（UHMWPE）に対する血液凝固系タンパク質の吸着挙動を解析した結果、すべての材料表面上で顕著に濃縮されたセロトニントランスポーター、コラーゲン Type XXIIa、VN、インテグリン $\alpha 1$ 、リポタンパク質（APOE）及びホスホリパーゼ D₅ が血液適合性評価マーカーとして利用できる可能性が示唆された²。さらに、PVP 含量の異なる PSF 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体表面に吸着するヒト血漿タンパク質の網羅的比較定量解析を行い、前述の対照材料の解析結果と比較検討した結果、内因系血液凝固活性化リガンドとして VN 及び FN、補体及び補体因子として C1r、C1s、C3、C5 及び FHR1、血液

凝固因子として FA7、FA9、FA12 及びフィブリノーゲン B 鎖 (FIBB) 並びにその他のタンパク質として GPX3 及び PLD5 が血液適合性評価マーカー候補タンパク質として選定された³⁾。

今回は、血液適合性評価マーカー候補タンパク質のひとつであるフィブリノーゲン及びフィブロネクチン並びに対照タンパク質としてアルブミンを用いて、PHEMA、PMEA 並びに組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体に対する吸着挙動を動力的に解析した。フィブリノーゲンは血液凝固第 I 因子とも呼ばれ、血液凝固の最終段階でトロンビンの作用によってフィブリンとなる血栓形成に欠かせない機能を持つタンパク質である。また、フィブロネクチンは、細胞外マトリックスを構成する主要な糖タンパク質のひとつで、細胞結合部位のアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列が、細胞膜上の受容体タンパク質であるインテグリンと結合する。

アルブミンは、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンに比べて結合定数が小さく、3 種類のタンパク質の中で被験ポリマー表面に最も吸着しにくい。また、材料間で吸着挙動に差は認められなかった (表 2)。

フィブリノーゲンは、アルブミン及びフィブロネクチンに比べて結合速度定数が大きく、3 種類のタンパク質の中で被験ポリマー表面に最も速やかに吸着すると考えられる。また、材料間では MEA 比率の増加に伴って結合速度定数が低下し、解離速度定数が増加した。すなわち、PMEA 表面にはフィブリノーゲンがゆっくり吸着し、吸着したフィブリノーゲンは速やかに脱着すると考えられる (表 3)。これらの傾向は、既報とよく一致する。

フィブロネクチンは、アルブミン及びフィブリノーゲンに比べて解離速度定数が大きく、被験ポリマー表面に吸着したフィブロネクチ

ンは速やかに脱着すると考えられる。また、材料間で吸着挙動に顕著な差は認められなかった (表 4)。

今年度は生体適合性及び血液適合性が高い PHEMA 及び PMEА 等を用いて検討したが、来年度は生体適合性及び血液適合性の低い高分子材料におけるタンパク質吸着挙動を評価し、今年度の結果と比較する予定である。さらに、フィブリノーゲン及びフィブロネクチン以外の血液適合性評価マーカー候補タンパク質 (ビトロネクチン等) の高分子材料への吸着挙動も解析する計画である。

E. 結論

血液適合性ポリマー等に対する血液適合性評価マーカー候補タンパク質の吸着挙動を動力的に解析するため、電極表面が PHEMA、PMEA 並びに組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体 (PHM7525、PHM5050 及び PHM2575) でコーティングされた QCM センサーを作製した。QCM 法により、これらのポリマー表面に対するアルブミン、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの吸着に伴う平衡定数及び速度定数を求めた。その結果、アルブミンは結合定数が小さく、被験ポリマー表面に最も吸着しにくく、材料間で吸着挙動に差は認められなかった。フィブリノーゲンは結合定数が大きく、被験ポリマー表面に最も吸着しやすく、材料間では MEA 比率の増加に伴って解離速度定数が増加し、結合定数が低下する傾向が認められた。フィブロネクチンは解離速度定数が大きく、被験ポリマー表面に吸着したフィブロネクチンは速やかに脱着すると考えられ、材料間で吸着挙動に顕著な差は認められなかった。ポリマーコートセンサーを用いた QCM 法によって、血液適合性ポリマー等に対するアルブミン、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの吸着挙動を動

力学的に解析することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Rumi Sawada, Ken Kono, Kazuo Isama, Yuji Haishima, Atsuko Matsuoka: The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 101A, 2573-2585 (2013)
- 2) Yuji Haishima, Kazuo Isama, Chie Fukui, Toshiyasu Yuba, Atsuko Matsuoka: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 101A, 2630-2643 (2013)
- 3) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：EU おける繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴、*国立医薬品食品衛生研究所報告*、131、66-74 (2013)
- 4) 味村真弓、中島晴信、吉田仁、吉田俊明、河上強志、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス (2,3-ジブロモプロピル) ホスフェイト分析法の改定に向けた検討、*薬学雑誌*、134、259-268 (2014)

- 5) Yuji Haishima, Tsuyoshi Kawakami, Chie Hasegawa, Akito Tanoue, Toshiyasu Yuba, Kazuo Isama, Atsuko Matsuoka, Shingo Niimi: Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, in press.
- 6) 伊佐間和郎：ナノマテリアルの in vitro 安全性評価のための基礎研究—金属酸化物ナノ粒子に対する細胞応答—、*薬学雑誌*、掲載予定

2. 学会発表

- 1) Rumi Sawada, Ken Kono, Kazuo Isama, Yuji Haishima, Atsuko Matsuoka: The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting* (2013.6, Boston)
- 2) Kazuo Isama, Tsuyoshi Kawakami, Atsuko Matsuoka: Surface characteristics and apatite-forming ability of calcium-incorporating titanium, *25th European Conference on Biomaterials* (2013.9, Madrid)
- 3) 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の表面特性とアパタイト形成能、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11、江戸川区)

- 4) 野村祐介、河上強志、福井千恵、柚場俊康、新藤智子、坂口圭介、谷川隆洋、犬飼香織、竹ノ内美香、伊佐間和郎、松岡厚子、新見伸吾、齋島由二：溶血性試験用陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シートの性能評価、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11、江戸川区)
- 5) 齋島由二、福井千恵、山崎佳世、野村祐介、小園知、熊田秀文、藤澤彩乃、井上薫、森川朋美、市村亮平、前田潤、高橋美和、河上強志、伊佐間和郎、柚場俊康、浜田信城、鄭雄一、小川久美子、新見伸吾、吉田緑：DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発—ラット精巢に及ぼす DOTP の影響評価—、日本薬学会第 134 年会 (2014.3、熊本市)
3. その他
 - 1) 伊佐間和郎：「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」、第 4 章第 3 節 金属系材料の細胞毒性の評価、技術情報協会、東京、pp.303-307 (2013)
- 3) 齋島由二、他：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、平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 (H24-医薬-指定-018) 分担研究報告書 (2013)
- 4) 岡畑恵雄、三原久和：酵素・タンパク質をはかる・とらえる・利用する、工学図書 (2009)
- 5) 岡畑恵雄：バイオセンシングのための水晶発振子マイクロバランス法—原理から応用例まで、講談社 (2013)
- 6) 中岡竜介、他：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、平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 (H24-医薬-指定-018) 分担研究報告書 (2013)

参考文献

- 1) 田中賢、他：Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) を用いた新規な血液適合性表面—PMEA 表面へのタンパク質吸着挙動—、人工臓器、29、209-216 (2000)
- 2) 齋島由二、他：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、平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 (H22-医薬-一般-009) 分担研究報告書 (2012)

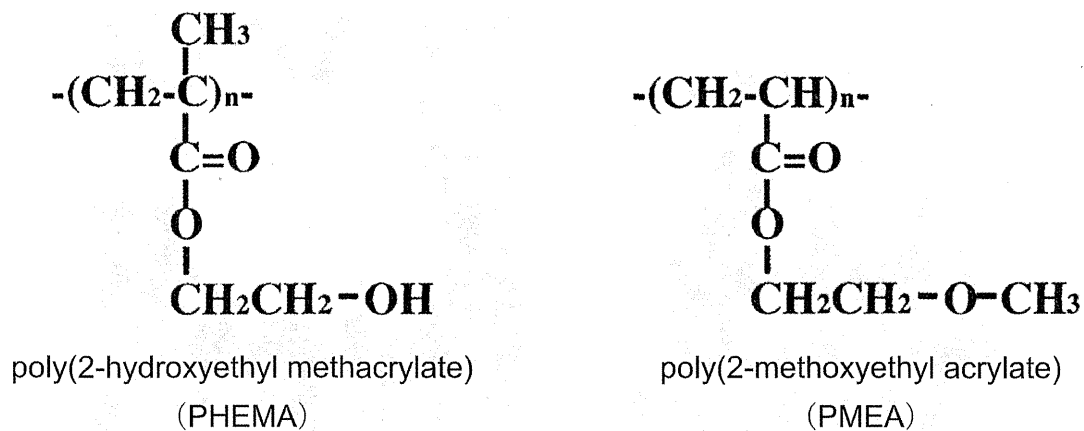


図1 PHEMA及びPMEAの化学構造

表1 ポリマーの組成比及び分子量⁶

Polymer	Feed composition	Copolymer composition		Molecular weight measured in DMF		
	HEMA (mol%)	HEMA content (mol%)	MEA content (mol%)	Mw	Mn	Polydispersity index (Mw/Mn)
PHEMA	100	100	0	379,012	153,872	2.46
PHM7525	75	82.7	17.3	255,976	101,610	2.52
PHM5050	50	48.7	51.3	219,846	53,580	4.10
PHM2575	25	25.1	74.9	116,514	18,412	6.33
PMEA	0	0	100	75,068	12,302	6.10

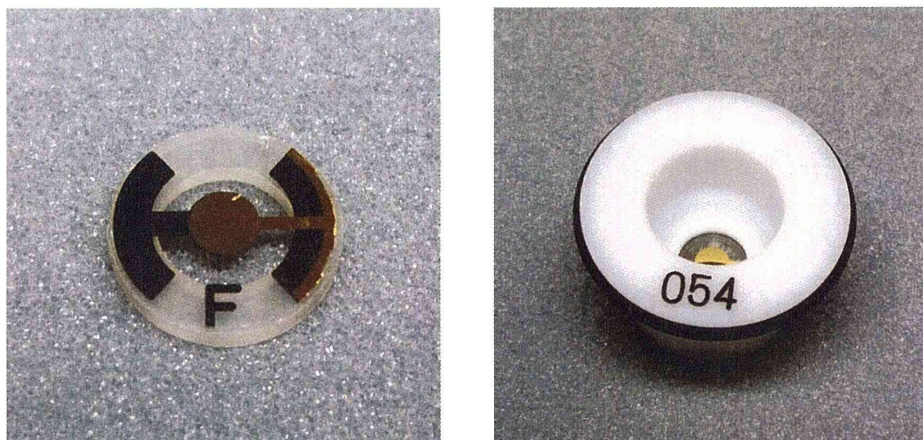


図2 金電極付き水晶板（左）及びQCMセンサーセル（右）



図3 QCM装置の外観（左）及び測定部（左）

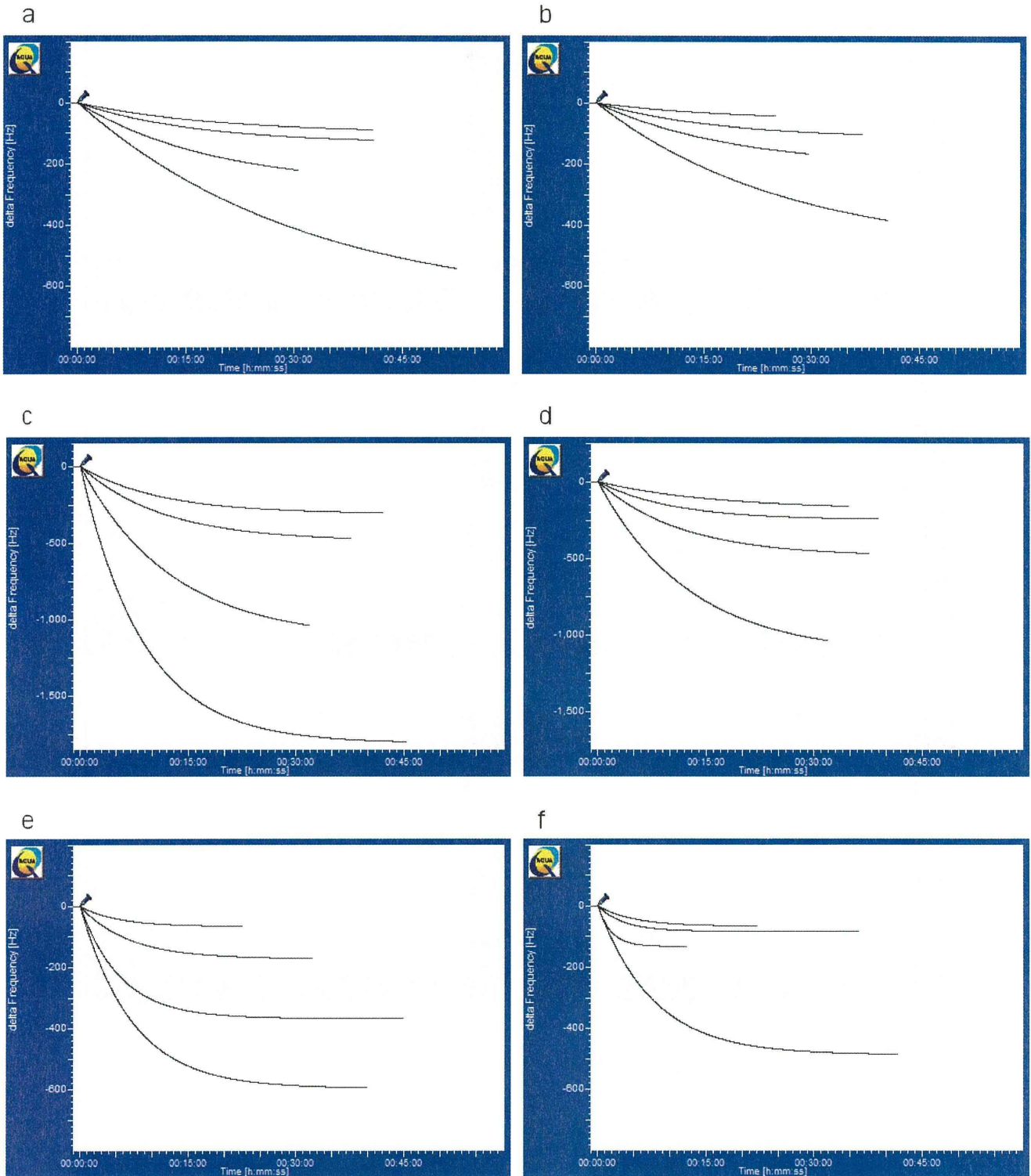


図4 PHEMA表面 (a, c, e) 及びPMEA表面 (b, d, f) に吸着するアルブミン (a, b)、
 フィブリノーゲン (c, d) 及びフィブロネクチン (e, f) のQCMセンサーグラム

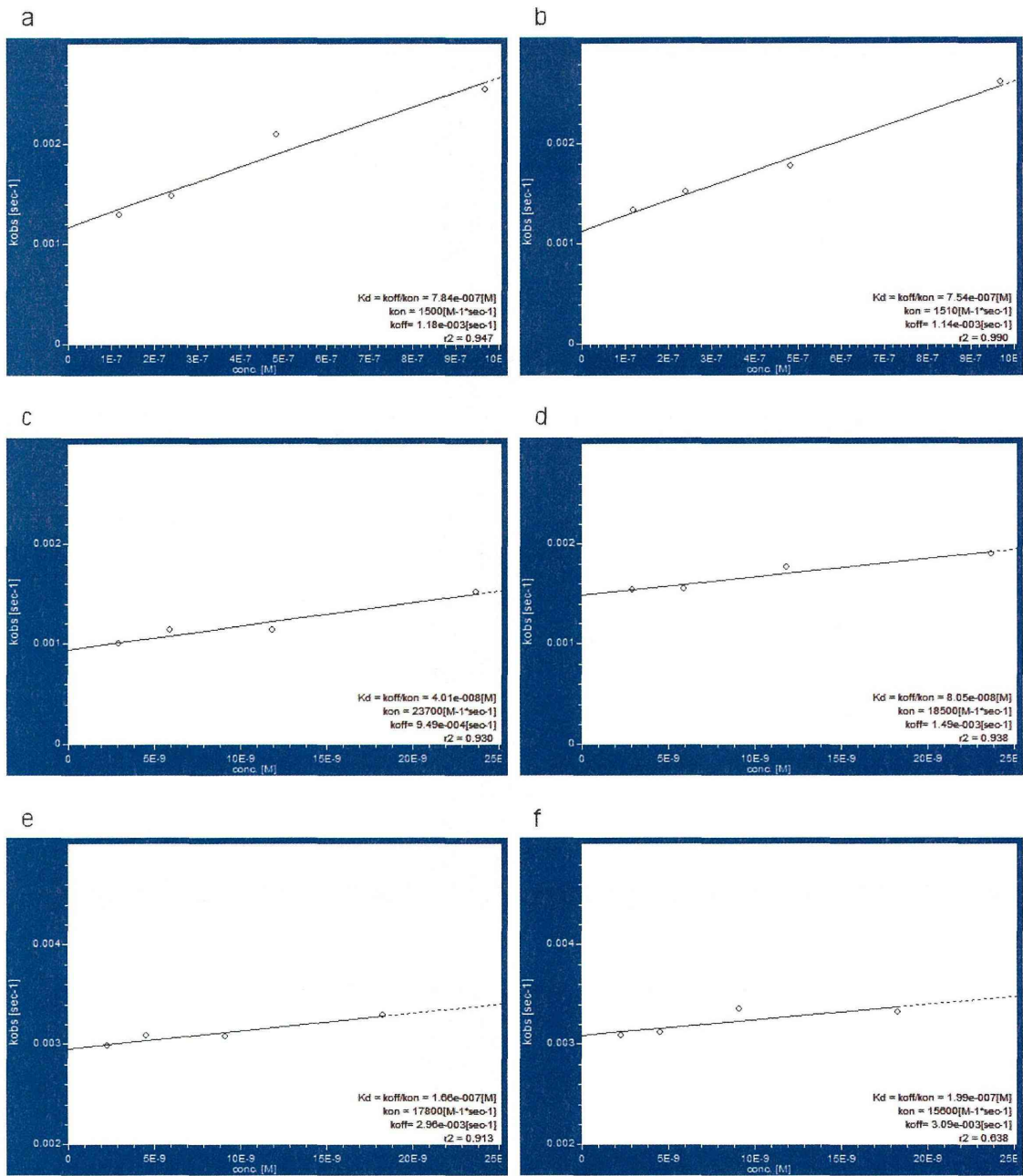


図5 PHEMA表面 (a, c, e) 及び PMEA表面 (b, d, f) に吸着するアルブミン (a, b)、
 フィブリノーゲン (c, d) 及びフィブロネクチン (e, f) の速度論的解析結果