

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

主任研究者	新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
分担研究者	藪島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
協力研究者	田中 賢	山形大学大学院理工学研究科
	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 25 年度の本研究では、平成 24 年度に選定した血液適合性評価マーカ候補蛋白質の絶対定量を行い、その有用性を検証した。

組成比の異なる 2-Methoxyethylacrylate (MEA)/ Hydroxyethylmethacrylate (HEMA) ランダム共重合体、Polyvinylpyrrolidone (PVP) 含量の異なるポリスルホン (PSF) 及びその他の一般合成高分子やチタン材料等、生体適合性の異なる 23 種類の材料に吸着する血漿・血清蛋白質を対象として比較検討した結果、第 7 因子 (FA7)、第 9 因子 (FA9)、第一補体成分 C1s、フィブロネクチン (FINC) 及びビトロネクチン (VTNC) が血液適合性評価マーカとして利用できることが確認された。第 XII 因子 (FA12)、フィブロネクチン (FIBB)、第一補体成分 C1r 及びグルタチオンペルオキシダーゼ 3 (GPX3) も評価マーカとして利用可能であるが、生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若干存在した。一方、第三補体 (C3)、第五補体 (C5)、補助因子 H 関連蛋白質 1 (FHR1) 及び不活性型ホスホリパーゼ D5 (PLD5) は偽陰性を示す材料が存在するため、評価マーカとして不適であることが判明した。

今後、ステント用金属材料、血栓捕捉デバイス及び血液透析器用中空糸等への血漿蛋白質吸着挙動を解析し、関連データを更に蓄積するにより、材料/細胞界面特性から高分子材料の血液適合性を評価する新規 *in vitro* 試験法の有用性を詳細に検証する。また、MEA/HEMA 系材料表面に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量を分析における標準誤差が統計学的に 95% 信頼区間に入るまで繰り返し測定し (n=10)、その平均値+10%RSD を血液適合性の適否を判定する閾値として提案する。

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きた。

平成24年度の本研究では、血液適合性

に優れた MEA/HEMA ランダム共重合体のほか、PVP 含量の異なる PSF を試験材料として選択し、各材料表面への蛋白質吸着挙動を解析し、過去に取得した対照合成高分子材料（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]）の解析結果と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候補蛋白質として選定した。

平成25年度の本研究では、過去に実施したチタン材料も含めて、上記の各種材料表面に吸着するこれらのマーカ候補蛋白質の絶対定量を行い、血液適合性評価マーカとしての有用性を検証した。

B．研究方法

(1)MEA/HEMA 表面の作製

メタノールで洗浄した菅原工芸製ポリカーボネート (PC) シート (33 mm、厚さ 0.1 mm) を ADVANTEC 製 PTFE メンブランフィルタ (47 mm、ポアサイズ 0.5 μm) を介して KYOWARIKEN 製スピンコータ (K-359SD-1 SPINNER) に固定し、4000 rpm 回転下、PMEA、PHEMA 及び組成比の異なる MEA/HEMA 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%、100 μL) を PC シートの中央に滴下し、10 秒間保持した。乾燥後、同様の操作を再度繰り返すことにより、表面を均一にコーティングした。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 PC シートを作製した。

(2) 血漿蛋白質の吸着と回収

PMEA、PHEMA 及び MEA/HEMA ランダム共重合体をコーティングした PC シート (10 枚 / 試料) をそれぞれ個別に 15 cm ガラス製シャーレ中で 20 mL のヘパリン加ヒト血漿 (コージンバイオ) に 37 °C で 1 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 の細胞溶解液 (尿素 7M、チオ尿素 2M、Tris 30 mM、CHAPS 4% : pH 8.5) 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、細胞溶解液に再溶解した後、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。

(3) その他の蛋白質試料¹⁻³⁾

種々の化学処理を施したチタン材料 (Ti1-6)、対照合成高分子材料 (PSF、C-PET、CTA、PS、PTFE 及び UHMWPE) 及び PVP 含量の異なる PSF 材料 (PSF1-6) の吸着蛋白質は過去の研究において調製した保存試料を使用した。各材料の詳細情報 (表面処理法、処方、物理化学的性状及び蛋白質吸着量等) については、過去の報告書に掲載済みである。

(4) 定量用標準品の化学合成

13 種類の血液適合性評価用マーカ候補蛋白質を定量するため、各材料表面に吸着した蛋白質の網羅的解析において共通

且つ高感度で検出されたペプチドを定量用プローブとして選択し、化学合成した (表 1)。内部標準用ペプチドは安定同位体標識した任意のアミノ酸を 1 残基導入して調製した (表 1:赤字部分)。

(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 µg) を含む細胞溶解液 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 4 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、0.2 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、1/10 容量の内部標準物質溶液を添加した後、LC-MS/MS 分析に供した。

(6) LC-MS/MS による定量分析

三連四重極型質量分析装置 TSQ Vantage (Thermo Scientific) を使用し、Selected reaction monitoring (SRM) モードにより定量分析を行った。試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 0.8 kV) により行った。キャピラリー温度、Q1 分解能、Q3 分解能、コリジョンガス圧及びサイクルタイムは、それぞれ 150 °C、0.5 unit、0.7 unit、1.2 mTorr 及び 15 秒とした。定量用標準品を利用した SRM チャンネルの最適化はダイレクトインヒュージョンモードにより行った。

Nano-LC としては、HTC-PAL オートサン

プレー (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。Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1% TFA) 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。

C. 研究結果

(1) SRM チャンネルの最適化

定量用標準品を利用して、ペプチド毎に定量用チャンネル、定性用チャンネル、内部標準用チャンネルを最適化し、トランジットイオン (プレカーサーイオン及びプロダクトイオン)、コリジョンエネルギー及び S-lens 電圧を設定した (表 2)。定量用及び内部標準用チャンネルとしては、最も感度良く検出されるプロダクトイオンを選択し、定性用チャンネルには、その他の特徴的な解列に由来する 4 種のプロダクトイオンを利用した。

(2) 検量線の作成

表 3 に示した濃度情報に基づいて標準品試料を調製し、LC-MS/MS モードで測定

することにより、検量線を作成した。各ペプチドの分離状況は良好であった (図 1)。図 2 に示したとおり、FA12 定量・定性用チャンネルは問題なく稼働し、その他のペプチド用に設定した各チャンネルのイオン検出状況も全て良好であった。また、各検量線の相関係数は 0.9966 から 1.0000 であり、いずれのペプチドともに低濃度領域から高濃度領域まで良好な相関が得られた (図 3)。

(3) 定量結果

図 4 に示したとおり、FA12 定量・定性用チャンネルのイオン検出状況は良好であり、その他のペプチド用の SRM チャンネルにも問題は認められなかった。

23 種類の材料に吸着する蛋白質を試料として、13 種類の血液適合性評価マーカ候補蛋白質を定量解析した結果を表 4 に示した。生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っており、特に C1s と VTNC の吸着量は MEA/HEMA 系材料とその他の材料間で大きく異なることが確認された。MEA/HEMA 系材料表面への FA12 吸着量も、その他の材料を下回っていたが、Ti-5 が MEA/HEMA 系材料に近い数値を示した。FIBB、C1r 及び GPX3 吸着量についても同様の傾向が認められたが、MEA/HEMA 系材料に近似した吸着量を示す材料が幾つか存在した。C3、C5、FHR1 及び PLD5 吸着量については、MEA/HEMA 系材料を下回る材料が幾つか確認された。

D. 考察

本研究では、生体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、23種類の材料表面に吸着する蛋白質を試料として、血液適合性評価マーカ候補蛋白質の絶対定量を行い、評価マーカとしての有用性を検証した。

血液凝固⁴⁻¹²⁾は内因系血液凝固と外因系血液凝固に大別される。血液凝固系は補体系や血管拡張、血管透過性亢進及び発痛を制御するカリクレイン・キニン系とも密接に関連している。これらの生体反応のメカニズムのほか、異物との接触により惹起される血液凝固及びエコノミークラス症候群の発症機序、リン脂質と血液凝固の相関性、細胞膜表面への組織因子の出現とサイトカイン刺激の相関性等については、過去に提出した報告書に詳細に記述した^{2,3)}。これらの知見は医用材料の血液適合性を理解するための基本となることから、本報告書と合わせて参照して頂きたい。

血液適合性材料として、超親水性表面、ミクロ相分離表面、細胞膜類似表面及び生理活性分子固定化表面等が開発され、その有効性が報告されて来たが、近年、材料表面の水和状態が血液適合性（抗血栓性）の要因である蛋白質吸着能や細胞接着能に深く関与することが明らかになりつつある。材料表面における水分子は存在様式により、超低温でも凍結しない不凍水、-50 付近で低温結晶を形成する中間水及び 0 で凍結する自由水に大別される。不凍水と自由水は多くの材料に共通して存在する水分子であるが、血液適合性の高い材料は不凍水と自由水のほか、中間水を持つことが確認されている。細胞膜と類似したベタイン構造を持つポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (PMPC) は中間水を有する代表的な高分子材料の 1 つであり、蛋白

質吸着能や細胞接着能が非常に低く、血栓が形成されない性質を持つことから、血液適合性が要求される医療機器や医用材料の表面加工に利用されている¹³⁻¹⁶⁾。PVP 及び PMEA も中間水を有する代表的な高分子材料である。PMEA は、有機溶媒への易溶解性、非水溶性、透明性、粘着性を併せ持っていることから様々な基材へのコーティングが可能である¹⁷⁻²⁴⁾。また、PMEA 表面は、血漿蛋白質の吸着・変性が少なく、脱離速度も早い特徴を持つことが知られている。PHEMA も蛋白質吸着が比較的少ない生体適合性材料であり、コンタクトレンズをはじめとした各種の医療機器に利用されている。PHEMA は、PMEA と異なり -50 付近に中間水ピークが認められないが、核酸や多糖類等の生体成分と同様、低温凝固水を有する高分子材料である。一方、本研究において使用したその他の材料は MEA/HEMA 系材料と比較して血液適合性に劣る材料である。

生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料とその他の対照材料に吸着する蛋白質量を標的プロテオミクス解析により比較検討し、平成 24 年度までに選定した 13 種類の血液適合性評価マーカ候補蛋白質の有用性を検証した結果、MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っており、特に C1s と VTNC の吸着量は MEA/HEMA 系材料とその他の材料間で大きく異なることが確認されたことから、これらの 5 種類の蛋白質は血液適合性評価マーカとして利用できることが明らかとなった。MEA/HEMA 系材料表面への FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 吸着量も、その他の材料を下回っていたが、MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若

干存在した。一方、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は偽陰性を示す材料が存在するため、評価マーカとして不適であることが判明した。

今後、ステント用金属材料、血栓捕捉デバイス及び血液透析器用中空糸等への血漿蛋白質吸着挙動を解析し、関連データを更に蓄積するにより、材料/細胞界面特性から高分子材料の血液適合性を評価する新規 *in vitro* 試験法の有用性を詳細に検証する。また、MEA/HEMA 系材料表面に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量を分析における標準誤差が統計学的に 95%信頼区間に入るまで繰り返し測定し (n=10) その平均値+10%RSD を血液適合性の適否を判定する閾値として提案する。

E . 結 論

生体適合性の異なる 23 種類の材料に吸着する血漿・血清蛋白質を対象として比較検討した結果、FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC が血液適合性評価マーカとして利用できることが確認された。FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 も評価マーカとして利用可能であるが、生体適合性に優れた MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若干存在した。一方、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は偽陰性を示す材料が存在するため、評価マーカとして不適であることが判明した。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表等

1)Haishima Y, Hasegawa C, Nonura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K,

Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, and Niimi S. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, in press (2014).

2)Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, and Niimi S. Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, in press (2014).

3)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*, 101:2630-2643 (2013).

4)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*, 101: 2573-2585 (2013).

5)Hoshino T, Narukawa Y, Haishima Y, Goda Y and Kiuchi F. Two new sulfated oleanan saponins from *Achyranthes* root. *J. Nat. Med*, 67:386-389 (2013).

6)中村里香, 酒井信夫, 靱島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀曉子, 安達玲子, 手島玲子. ショットガ

- ンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析．国立医薬品食品衛生研究所報告，131:50-57 (2013)．
- 7) 藪島由二，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：ラット精巣に及ぼす DOTP の影響評価．日本薬学会第 134 年会（2014 年 3 月・熊本）．
- 8) 藪島由二，福井千恵，澤田留美，河野健，野村祐介，新見伸吾．ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価．第 13 回日本再生医療学会総会（2014 年 3 月・京都）．
- 9) Uematsu M, Haishima Y, Nakaoka R, Niimi S, Segawa K, and Nakano T. A novel evaluation methodology of materials for medical devices based on molecular dynamics simulation. The 15th International Conference on Biomedical Engineering (Jan., 2013 in Singapore)．
- 10) 藪島由二，福井千恵，長部真博，上野良之，菅谷博之，棚橋一裕，野村祐介，松岡厚子，新見伸吾．ポリスルホン材料表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析：PVP 含量と血液適合性の相関性について．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013 年 11 月・船堀）．
- 11) 藪島由二，福井千恵，田中 賢，野村祐介，松岡厚子，新見伸吾．HEMA/MEA ランダム共重合体表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析：血液適合性評価マーカの選定について．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013 年 11 月・船堀）．
- 12) 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，藪島由二．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 年 11 月・船堀）．
- 13) 加藤玲子，藪島由二，福井千恵，澤田留美，宮島敦子，新見伸吾．生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響（2）：タンパク質発現の網羅的解析．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013 年 11 月・船堀）．
- 14) 植松美幸，藪島由二，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（2013 年 11 月・船堀）．
- 15) 中岡竜介，比留間 瞳，藪島由二，新見伸吾．SAM を利用したベタイン構造模倣表面調製とその構造に関する研究．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013 年 11 月・船堀）．
- 16) 中村里香，藪島由二，福井千恵，鈴木孝昌，中村亮介，安達玲子，手島玲子．加水分解小麦(グルパール 19S)に特異的に発現するペプチドの探索及び同定．第 50 回全国衛生化学技術協議会年会（2013 年 11 月・富山）．
- 17) 植松美幸，藪島由二，中岡竜介，瀬川勝智，中野達也．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). 第42回医用高分子シンポジウム(2013年7月・青海).

- 18) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, and Matsuoka A. 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 (Jun., 2013 in Boston).
- 19) 特願 2013-104082 (平成 25 年 5 月 16 日)「血液バッグ」. 発明者: 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 柚場俊康.

参照資料

- 1) 藪島由二. 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 22 年度厚生科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合)研究事業. 「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(H22-医薬-一般-009)」分担研究報告書.
- 2) 藪島由二. 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(H22-医薬-一般-009)」分担研究報告書.
- 3) 藪島由二. 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」(H24-医薬-指定-018)」分担研究報告書.
- 4) 山本一彦, 他. カラー図解: 靭帯の正常構造と機能, . 血液・免疫・内分泌, 日本医事新報社, 2002 年.
- 5) 森 亘, 桶田理喜. 基礎病理学 第 7 版(監訳: ロビンス), 廣川書店, 2004 年.
- 6) 藤巻道男. 出血傾向のスクリーニング検査, 日本医師会雑誌, 109(2): 220-224 (1993).
- 7) 鈴木宏治. 血液凝固と血小板, 日本医事新報, 4313: 87-88 (2006).
- 8) 吉岡章, 杉本充彦. アンチトロンピン(AT)、プロテイン C(PC)、プロテイン S(PS): 最新臨床検査のABC, 日本医師会雑誌, 135(2): S89-90 (2006).
- 9) 鈴木宏治. プロテイン C、プロテイン S、APC レジスタンス、トロンボモジュリン: 臨床検査ガイド 1999-2000, 696-702 頁、文光堂, 1999 年.
- 10) 藤田稔清. 血小板凝集能亢進症: 重要で新しい血管の危険因子, 日本医事新報 4238: 26-32 (2005).
- 11) 高志昌宏, 大滝隆行, 小又理恵子. 5. 冠動脈血栓, Nikkei Medical, 2000 年 1 月号: 75 頁.
- 12) 川合陽子. 偽血小板減少症を確認するための再採血, 日本医事新報, 4299: 90-91 (2006).
- 13) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi. J. Biomed. Mater. Res., 39: 323 (1998).
- 14) K. Ishihara, E. Ishikawa, T. Mihara, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi. J. Biomater. Scie. Polym. Ed., 10: 1047 (1999).
- 15) H. Kitano, M. Imai, T. Mori, M. Gemmei-Ide, Y. Yokoyama and K. Ishihara. Langmuir, 19: 10266 (2003).
- 16) T. Hatakeyama, M. Tanaka and H. Hatakeyama. Acta. Biomaterialia., 3: 6091 (2009).
- 17) M. Tanaka, T. Motomura, M. Kawada, T. Anzai, Y. Kasori, T. Shiroya, K. Shimura, M. Onishi and A. Mochizuki. Biomaterials,

- 21 : 1471 (2000).
- 18) M. Tanaka, T. Motomura, N. Ishii, K. Shimura, M. Onishi, A. Mochizuki and T. Hatakeyama. *Polym. Int.*, 49 : 1709 (2000).
 - 19) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Motomura, K. Shimura, M. Ohnishi and Y. Okahata. *Colloids. Surf., A*, 193 : 145 (2001).
 - 20) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Shiroya, T. Motomura, K. Shimura, M. Ohnishi and Y. Okahata. *Colloids. Surf., A*, 203 : 195 (2002).
 - 21) T. Ansai, A. Okumura, M. Kawamura, K. Yokoyama, H. Oshiyama, T. Kido and C. Nojiri. *Jpn. J. Artif. Organs.*, 9 : 73(2000).
 - 22) N. Saito, S. Motoyama and J. Sawamoto. *Jpn. J. Artif. Organs.*, 24 : 547 (2000).
 - 23) M. Tanaka and A. Mochizuki, *J. Biomed. Mater. Res., A*, 68 : 684 (2004).
 - 24) M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura and T. Hatakeyama. *Biomacromolecules*, 3 : 36 (2002).

表1. 血液適合性評価マーカ定量用プローブ

Protein code	Protein name	Start/End	Sequence of unique peptide in PD	Isotope label	Modification	Charge	Calculated [M+H] ⁺ (Cold)	Theoretical MW of hot peptide
VTNC	Vitronectin	198-212	DVWGIEGPIDAA F TR	13Phe:13C9, 15N	None	2	1646.81694	1655.83633
C1r	Complement C1r subcomponent	668-682	WVATGIVSWGIG G SR	12Gly:13C2, 15N	C13 (Carbamidomethyl)	2	1648.82536	1650.82130
C1s	Complement C1s subcomponent	524-534	TNFDNDIAL V R	10Val:13C5, 15N	None	2	1277.64751	1282.65350
C3	Complement C3	531-544	LVAYYTLIGAS G QR	12Gly:13C2, 15N	None	2	1511.82036	1513.81630
C5	Complement C5	79-90	FGNSAILTIQ P K	11Pro:13C5, 15N	None	2	1359.76225	1364.76824
FA12	Coagulation factor XII	373-381	WVGG L VALR	8Leu:13C6, 15N	None	2	883.57256	889.58190
FA7	Coagulation factor VII	338-350	FSLVSGWG L LDR	11Leu:13C6, 15N	None	2	1477.77715	1483.78649
FA9	Coagulation factor IX	365-373	SALV L QYLR	8Leu:13C6, 15N	None	2	1062.6314	1066.64074
FIBB	Fibrinogen beta chain	335-348	MG P TELLIEMED W K	14Lys:13C6, 15N2	None	2	1691.80449	1698.81087
FHR1	Complement factor H-related protein 1	271-281	EIMEN Y NIALR	10Leu:13C6, 15N	None	2	1365.68242	1371.69176
GPX3	Glutathione peroxidase 3	186-197	FLV G PDG P IMR	10Ile:13C6, 15N	None	2	1314.72356	1320.73290
FINC	Fibronectin	959-976	NTFAE V TGLSPGV T Y F K	17Phe:13C9, 15N	None	2	1993.98821	2003.00760
PLD5	Inactive phospholipase D5	380-386	LLLS F W K	5Phe:13C9, 15N	None	2	906.54106	915.56045

表2. SRMチャンネル条件

Protein	Ion type	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	S-Lens (V)
FA12	Quan ion	442.500	685.0	15	106
	Qual 1	442.501	458.0	14	106
	Qual 2	442.502	426.0	11	109
	Qual 3	442.503	359.0	14	109
	Qual 4	442.504	199.1	14	109
	IS	446.000	692.0	16	110
PLD5	Quan ion	453.900	680.0	13	110
	Qual 1	453.901	567.0	15	115
	Qual 2	453.902	340.2	12	115
	Qual 3	453.903	333.2	22	104
	Qual 4	453.904	227.1	14	107
	IS	459.000	690.0	13	108
FA9	Quan ion	532.100	692.2	19	127
	Qual 1	532.101	791.2	17	127
	Qual 2	532.102	579.3	17	127
	Qual 3	532.103	451.3	25	127
	Qual 4	532.104	371.2	15	127
	IS	535.600	699.2	18	127
C1s	Quan ion	639.600	1062.0	21	160
	Qual 1	639.601	915.2	24	160
	Qual 2	639.602	571.2	27	160
	Qual 3	639.603	458.3	22	162
	Qual 4	639.604	216.1	22	162
	IS	642.600	1068.0	23	162
GPX3	Quan ion	658.100	955.0	21	152
	Qual 1	658.101	1054.0	24	152
	Qual 2	658.102	898.0	21	152
	Qual 3	658.103	527.8	15	152
	Qual 4	658.104	516.3	19	152
	IS	661.600	962.0	22	153
C5	Quan ion	680.700	1084.0	20	197
	Qual 1	680.701	812.0	19	192
	Qual 2	680.702	970.0	21	192
	Qual 3	680.703	586.0	21	196
	Qual 4	680.704	372.1	18	196
	IS	683.700	1090.0	23	165
FHR1	Quan ion	683.650	883.0	25	157
	Qual 1	683.651	1123.0	27	157
	Qual 2	683.652	992.0	21	157
	Qual 3	683.653	586.0	22	157
	Qual 4	683.654	359.2	22	157
	IS	687.150	870.0	25	146
FA7	Quan ion	739.700	1031.0	24	168
	Qual 1	739.701	1130.1	26	168
	Qual 2	739.702	944.2	22	179
	Qual 3	739.703	701.0	26	179
	Qual 4	739.704	348.1	26	179
	IS	743.200	1038.0	26	179
C3	Quan ion	756.700	575.0	23	189
	Qual 1	756.701	1065.0	23	193
	Qual 2	756.702	902.0	28	193
	Qual 3	756.703	447.2	21	193
	Qual 4	756.704	360.2	20	193
	IS	758.200	578.0	23	193
VTNC	Quan ion	824.200	946.8	28	193
	Qual 1	824.201	1245.8	26	193
	Qual 2	824.202	1075.8	25	193
	Qual 3	824.203	890.0	30	193
	Qual 4	824.204	458.2	32	202
	IS	829.200	956.8	24	202
C1r	Quan ion	825.250	922.0	28	214
	Qual 1	825.251	1363.0	29	215
	Qual 2	825.252	1021.0	25	215
	Qual 3	825.253	649.0	26	232
	Qual 4	825.254	479.0	26	243
	IS	826.750	925.0	26	236
FIBB	Quan ion	846.700	837.0	28	222
	Qual 1	846.701	1176.0	29	208
	Qual 2	846.702	1063.0	29	197
	Qual 3	846.703	950.0	31	216
	Qual 4	846.704	448.1	20	232
	IS	850.700	845.0	28	224
FINC	Quan ion	997.900	974.0	30	220
	Qual 1	997.901	1332.0	37	229
	Qual 2	997.902	1231.0	30	250
	Qual 3	997.903	1061.0	33	265
	Qual 4	997.904	721.0	25	251
	IS	1002.900	984.0	27	227

Capillary temperature = 150 °C
 Spray voltage = 800V (positive mode)
 Q1 resolution = 0.5 unit Q3 resolution = 0.7 unit
 Collision gas pressure = 1.2 mTorr
 Cycle time = 15 sec

表3. 検量線情報

ペプチド	初濃度 (ng/mL)	希釈系列 (倍)	ポイント数	内標濃度 (ng/mL)	内標 添加量	内標最終 濃度 (ng/mL)
C1r	48.26	10	5	504.0	1/10	45.82
C1s	20.37	10	5	196.0	1/10	17.82
C3	21.36	10	5	195.0	1/10	17.73
C5	19.29	10	5	185.0	1/10	16.82
FA12	20.27	10	5	174.0	1/10	15.82
FA7	20.67	10	5	228.0	1/10	20.73
FA9	22.45	10	5	188.0	1/10	17.09
FHR1	25.52	10	5	200.0	1/10	18.18
FIBB	505.50	2	5	4080.0	1/10	370.91
FINC	19.19	10	5	235.0	1/10	21.36
GPX3	20.97	10	5	202.0	1/10	18.36
PLD5	22.95	10	5	175.0	1/10	15.91
VTNC	40.55	10	5	392.0	1/10	35.64

表4. 血液適合性評価マーカ候補蛋白質の定量結果

(amol/cm²)

Material	FA7	FA9	FA12	FIBB	C1r	C1s	C3	C5	FHR1	FINC	VTNC	GPX3	PLD5	
PMEA	11.90	6.60	5.36	12843.12	NF	NF	4.33	0.57	0.85	0.17	7.29	19.44	5.80	
MEA/HEMA (75:25)	3.16	0.41	1.36	3591.91	NF	0.08	33.25	0.18	17.61	NF	1.48	5.49	0.64	
MEA/HEMA (50:50)	2.57	0.75	1.68		IS	80.77	0.12	65.60	0.01	11.50	0.70	9.82	7.20	1.30
MEA/HEMA (25:75)	1.05	4.78	4.20		IS	111.45	0.36	56.65	17.36	8.84	0.54	2.71	19.27	3.99
PHEMA	4.59	4.35	3.84	12362.8	350.6	0.16	128.9	0.60	20.8	4.07	4.87	8.23	2.62	
PSF	4122.04	3629.16	19102.48	4221556.85	177118.33	10041.50	19243.29	1964.99	19504.79	12058.44	718869.40	37745.40	448.55	
C-PET	42.45	232.98	18.26	32779.25	1005.80	30.20	367.35	8.66	82.10	887.47	11371.42	94.16	11.43	
CTA	551.12	434.69	1448.04	1774936.11	25833.70	6005.76	133029.16	2005.23	1771.10	232.25	74337.25	4715.26	61.54	
PS	41.43	80.20	18.89	42207.51	418.66	80.46	248.47	4.04	40.60	2336.86	4655.15	24.54	0.32	
PTFE	192.33	140.83	15.22	22230.86	219.73	13.16	453.46	85.83	30.18	49.30	1572.24	436.99	3.98	
UHMPE	112.17	330.06	39.99	48155.44	549.15	70.00	188.92	22.29	56.41	2373.24	5118.91	82.17	6.32	
PSF_1	IS	2077.45	309.02	IS	19671.42	IS	877.38	NF	IS	522.63	IS	65259.36	344.81	
PSF_2	IS	6741.42	748.94	IS	IS	IS	4977.57	39.59	IS	1157.20	IS	54770.34	139.90	
PSF_3	5835.01	5891.12	3824.64	IS	78351.16	1508.06	38855.04	1893.84	27356.01	10664.57	IS	37757.64	1116.57	
PSF_4	29103.76	23933.32	3509.71	IS	143256.34	10633.09	33869.70	4320.79	93016.88	2936.58	IS	104636.80	1342.11	
PSF_5	20768.11	5157.45	3615.09	IS	29077.61	1601.59	18263.11	1174.40	26301.27	5225.16	IS	67364.27	76.62	
PSF_6	583.70	38.92	21.82	IS	IS	14.34	6.20	NF	28.22	IS	IS	1196.45	13.59	
TI_1	566.14	89.97	10.71	22106.04	6039.00	395.38	69.31	0.47	17.79	IS	11945.17	40.30	3.46	
TI_2	5606.44	8874.74	24823.42	243920.15	17299.64	1654.33	5043.29	1928.01	47001.67	4049.16	IS	3360.55	38.62	
TI_3	674.81	289.88	36.46	40848.45	7203.56	851.15	46.53	11.75	37.18	136.09	40162.10	332.05	11.26	
TI_4	38816.92	15314.59	7562.53	310027.34	27322.37	3958.57	3120.50	2916.46	5048.42	3030.16	IS	2348.00	15.59	
TI_5	266.60	56.86	6.74	14057.15	1350.50	91.49	5.79	1.07	7.70	21.95	4577.16	31.55	3.01	
TI_6	398.92	97.98	28.06	IS	5245.59	165.50	12.46	8.28	88.48	IS	9594.58	32.26	7.71	

NF, not found. IS, ion suppression

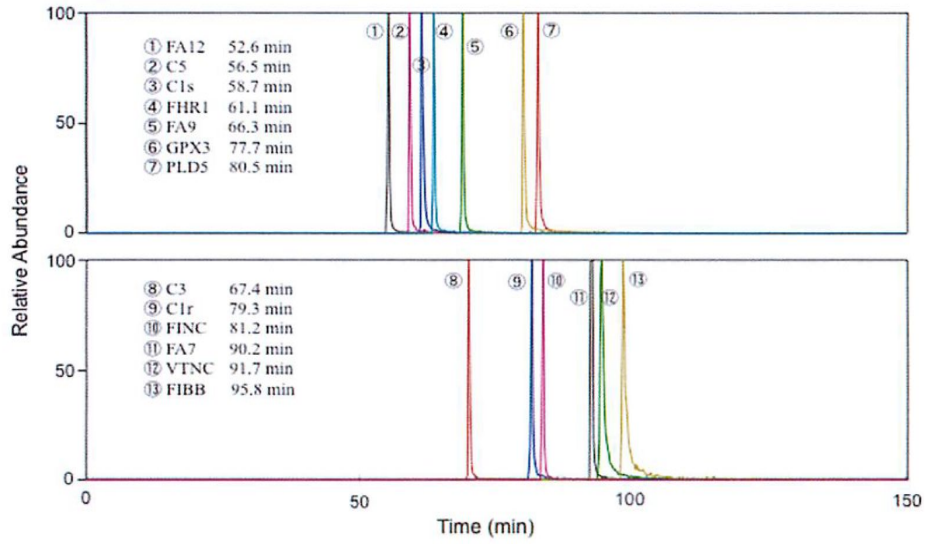


図1. LC-MS/MS分析における標準品の保持時間とピーク分離状況

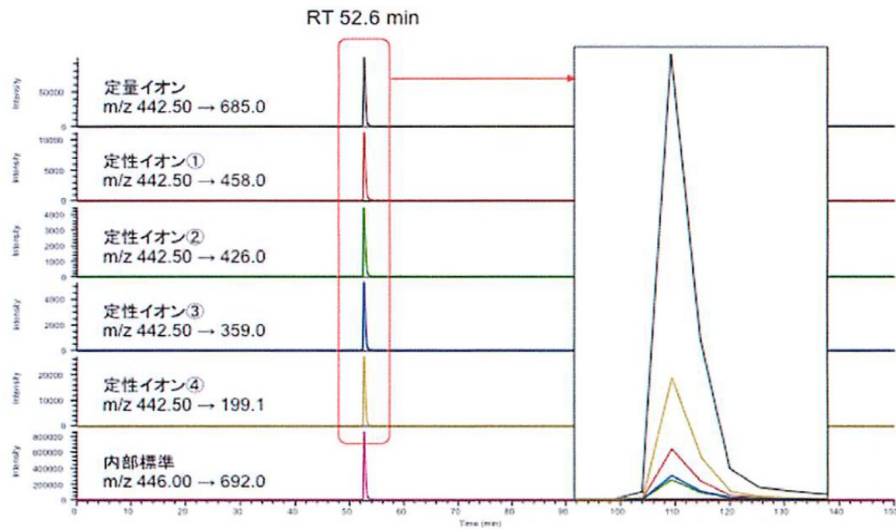


図2. FA12定性・定量用チャンネルのイオン検出状況(標準品)

相関係数	
FA7	0.9999
FA9	0.9995
FA12	0.9997
FIBB	0.9975
C1s	0.9992
C1r	0.9991
C3	0.9997
C5	0.9997
FHR1	0.9966
FINC	1.0000
VTNC	0.9998
GPX3	0.9999
PLD5	0.9998

FA12用検量線

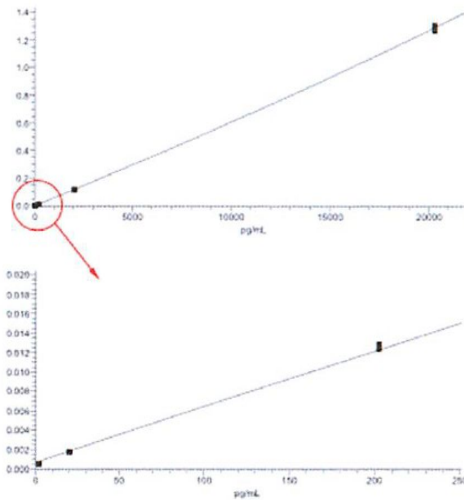


図3. 検量線の相関係数とFA12用検量線

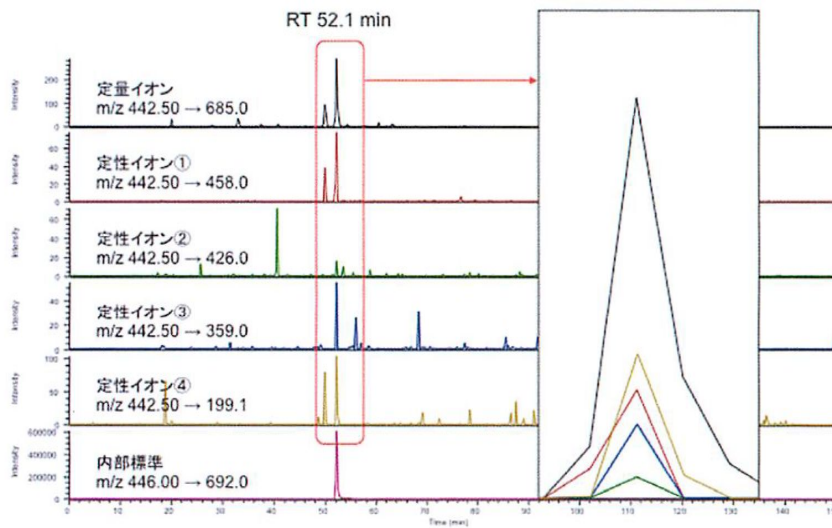


図4. FA12定性・定量用チャンネルのイオン検出状況(実試料:Ti-2)