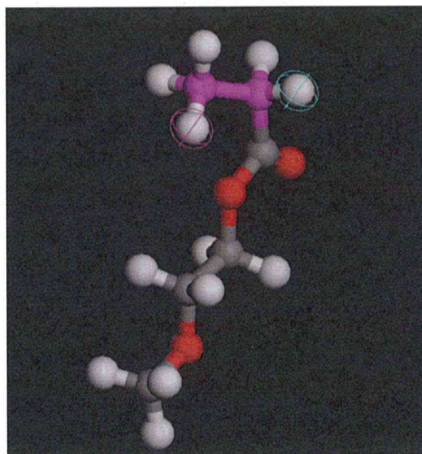
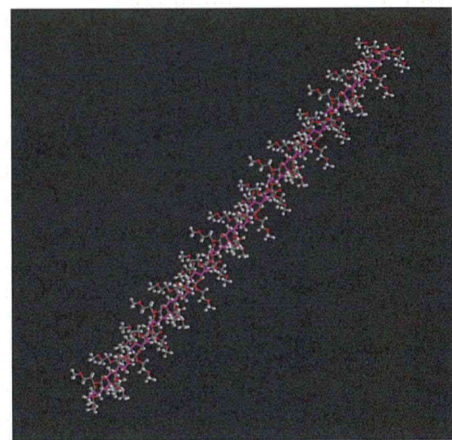


図 1 MEA の分子構造式



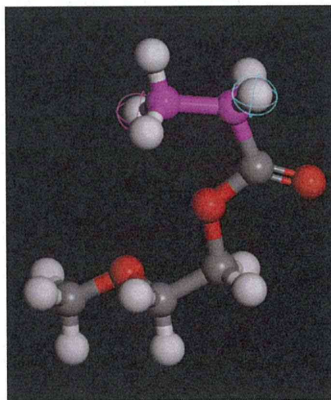
(a) エネルギー最小の MEA

青 : Head、赤 : Tail



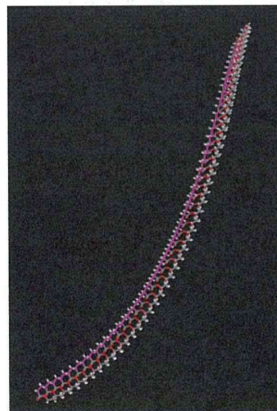
(b) a の 50 量体

図 2 MEA の 50 量体の作成



(a) エネルギー最小の MEA

青 : Head、赤 : Tail



(b) a の 50 量体



(c) b に構造最適化と
Dynamics (NVT) をかけた

図 3 MEA の 50 量体の作成

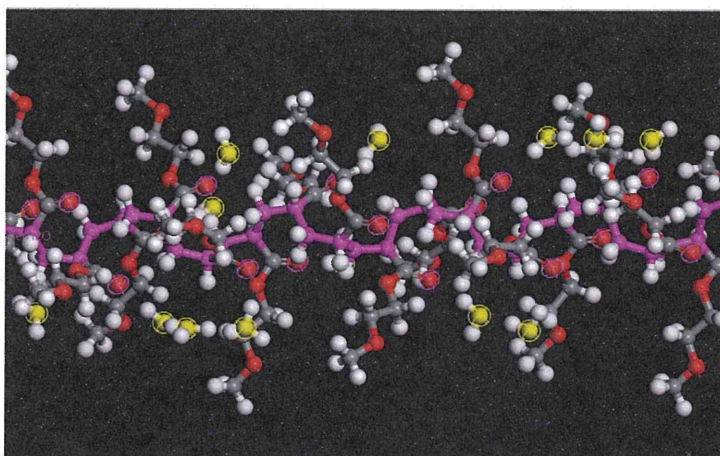


図 4 MEA の 50 量体のエステル結合カルボニル酸素原子に 50 個の水分子を吸着

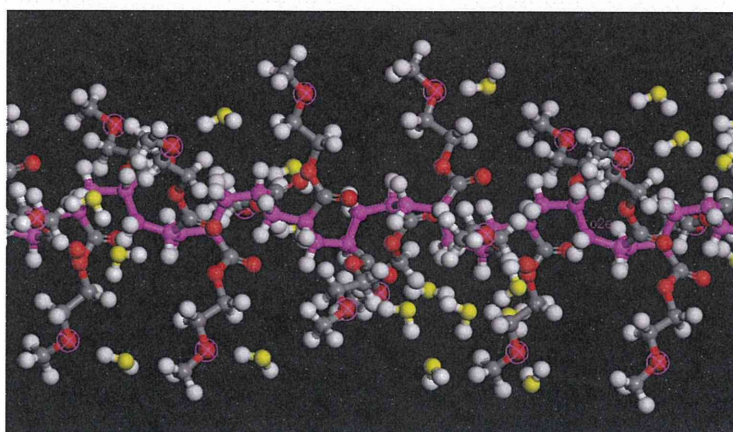


図 5 MEA の 50 量体のメトキシ基の酸素原子に 50 個の水分子を吸着

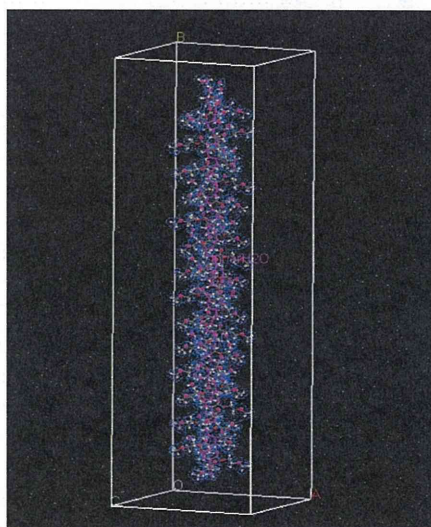


図 6 格子内に 50 量体の MEA を配置

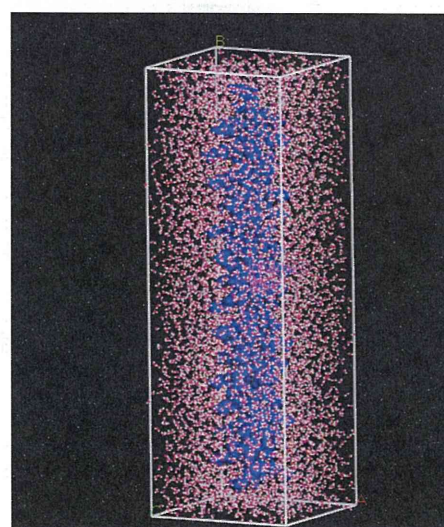
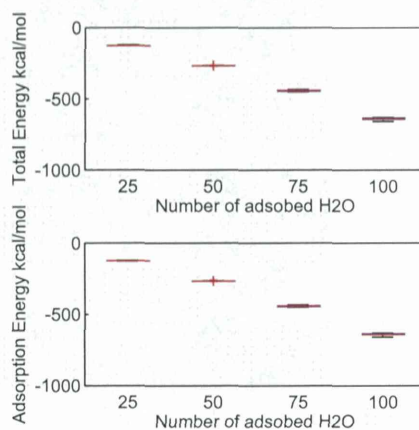
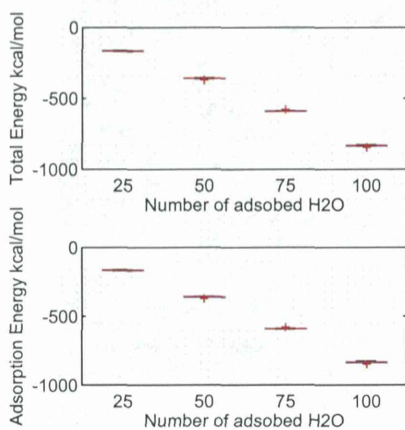


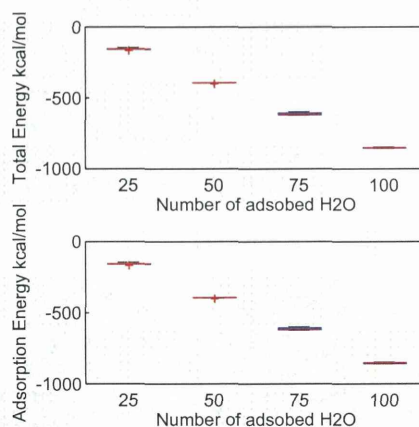
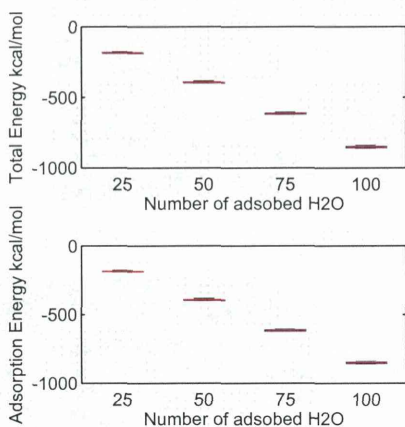
図 7 格子内の空き領域に水分子を配置



(a) エステル結合カルボニル酸素原子

(b) メトキシ基の酸素原子

図 8 MEA の 50 量体のエステル結合カルボニル酸素原子に 50 個の水分子を吸着させたときの全体のエネルギーと吸着エネルギーに関する箱ひげ図 (力場は COMPASS II)



(a) エステル結合カルボニル酸素原子

(b) メトキシ基の酸素原子

図 9 MEA の 50 量体のメトキシ基の酸素原子に 50 個の水分子を吸着させたときの全体のエネルギーと吸着エネルギーに関する箱ひげ図 (力場は Universal)

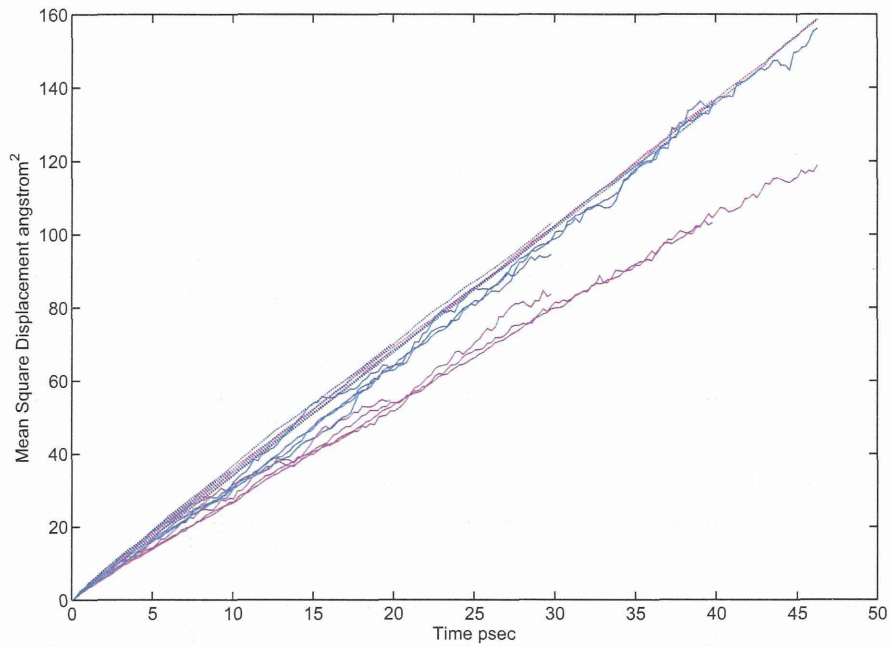


図 10 MEA の 50 量体の 2 種類の酸素原子に対する水分子の平均 2 乗変位
 (赤：エステル結合カルボニル酸素原子、青：メトキシ基の酸素原子、
 実線：最初に吸着させた 50 個の水分子、破線：全水分子)

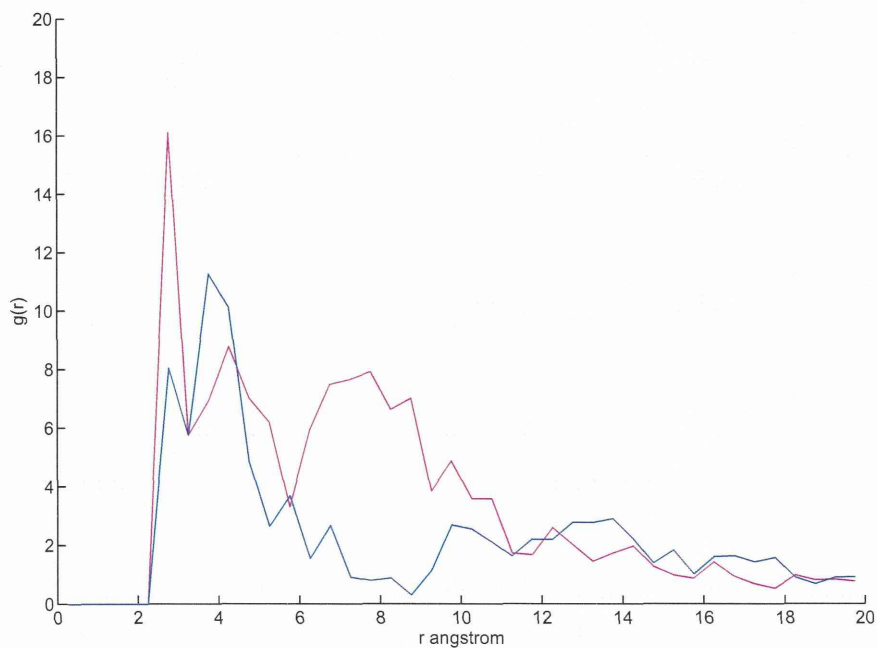


図 11 MEA の 50 量体の 2 種類の酸素原子に 50 個の水分子を吸着させたときの
 動径分布関数 (赤：エステル結合カルボニル酸素原子、青：メトキシ基の酸素原子)

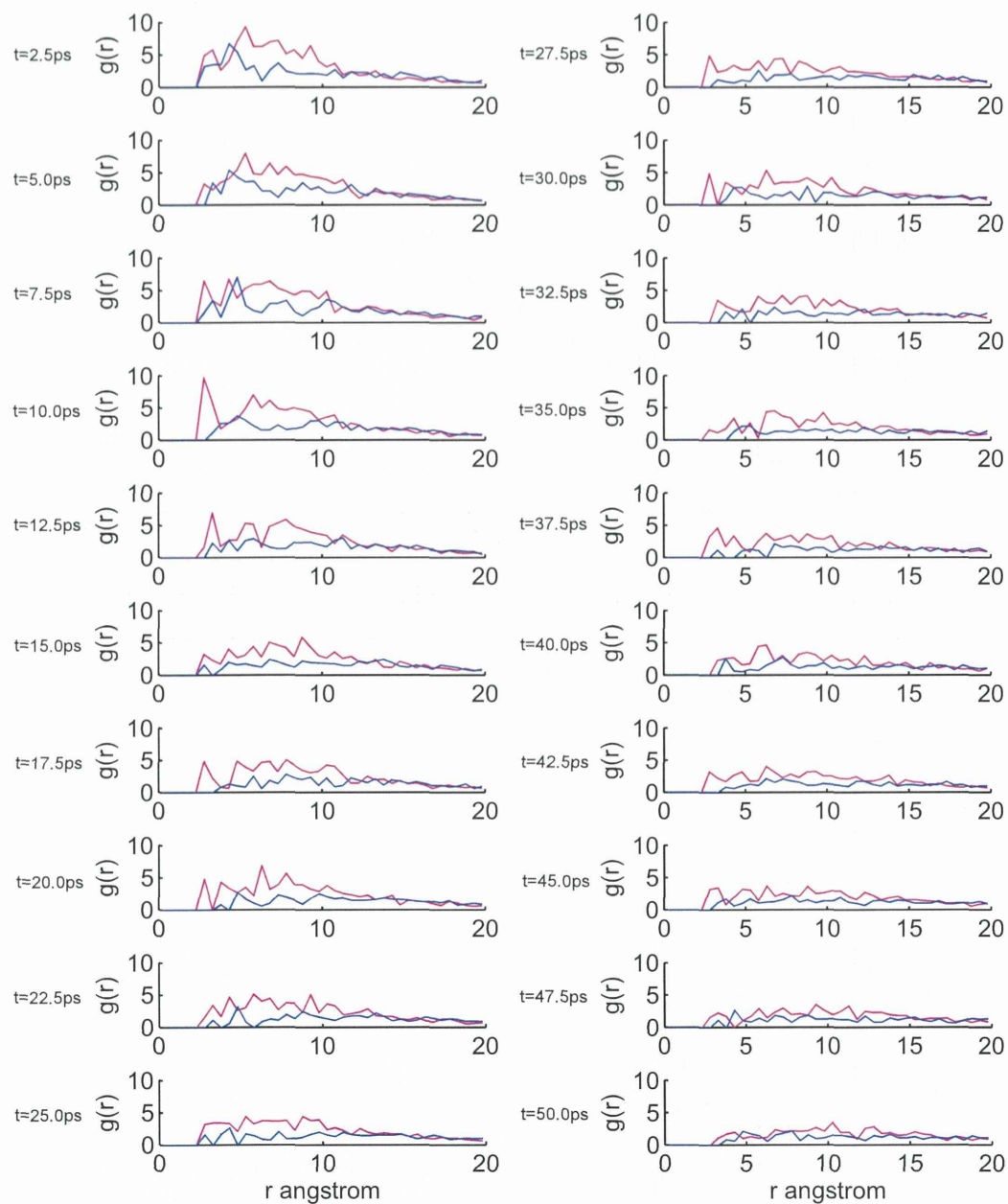


図 12 MEA の 50 量体の酸素原子に 50 個の水分子を吸着させた後、周りを水分子で囲み、分子動力学シミュレーションを行ったときの 2.5psec から 50.0psec までの時間経過
 (赤：エステル結合カルボニル酸素原子に吸着させた水分子、
 青：メトキシ基の酸素原子に吸着させた水分子)

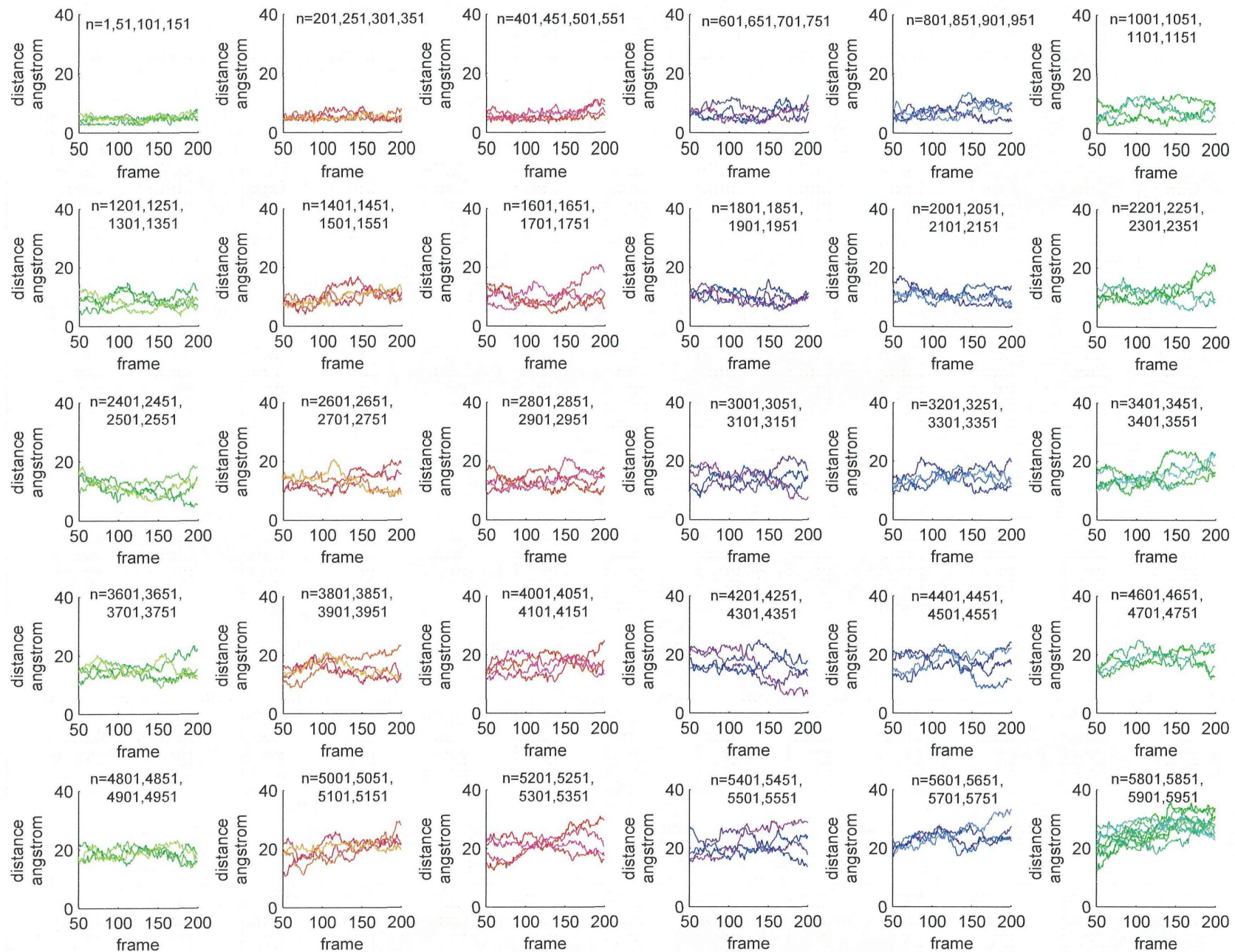


図13 MEAの50量体に6133個の水分子を配置して分子動力学シミュレーションを行い、平衡状態となったときについて、各水分子とMEA内のメトキシ基の酸素原子とが最近接距離となる距離を表示した結果（水分子とメトキシ基との距離の平均値で水分子を並び替えて番号を付与した。1番目から200番ごとに5951番目までの結果を示した。）

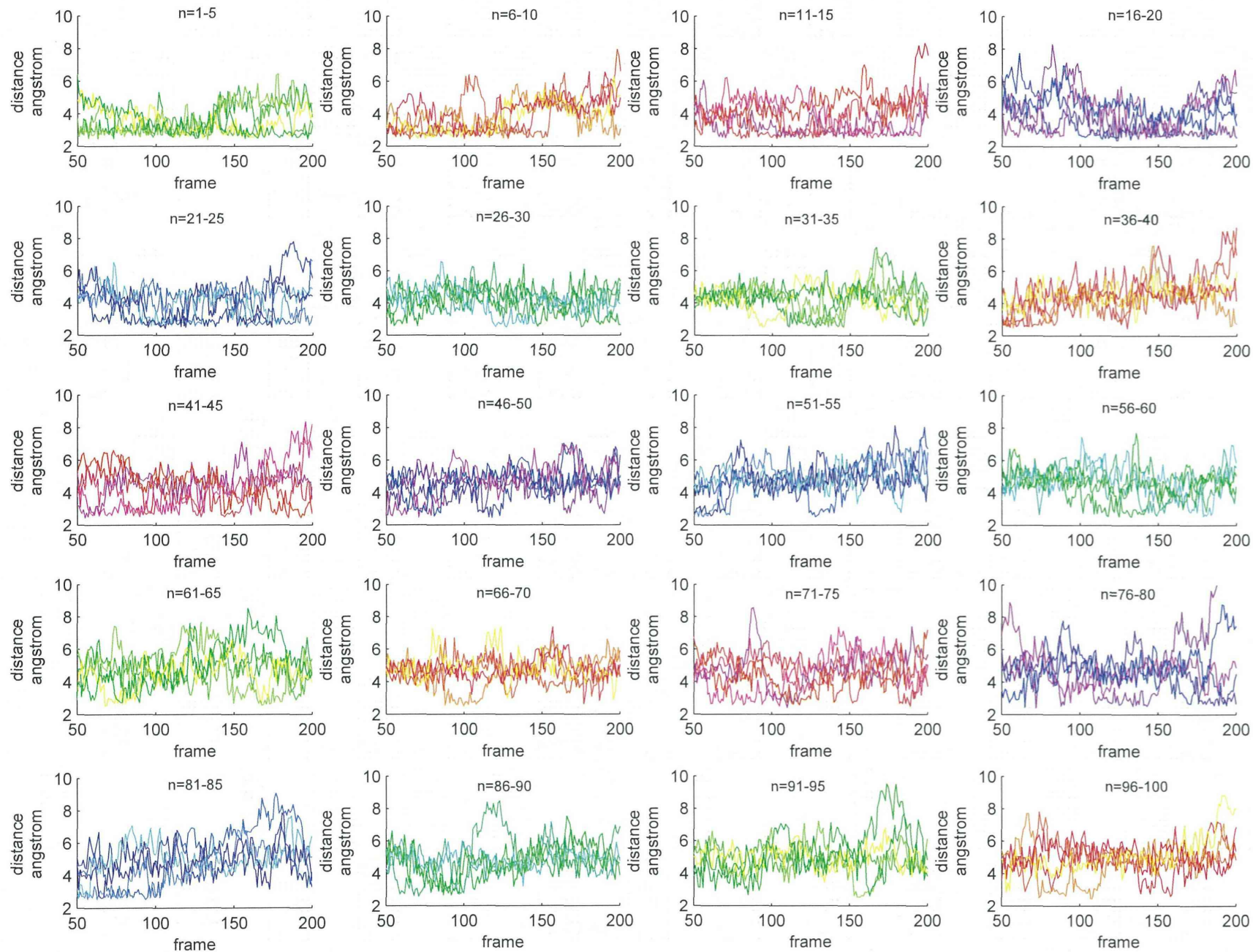


図14 MEAの50量体に6133個の水分子を配置して分子動力的シミュレーションを行い、平衡状態になったときについて、各水分子とMEA内のメトキシ基の酸素原子とが最近接距離となる距離を表示した結果（1番目から100番目までの結果を示した。）

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

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

研究要旨：ポリマー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、電極表面が血液適合性ポリマーである poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)、poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体 (PHM7525、PHM5050 及び PHM2575) 並びに汎用ポリマーであるポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリブチレンテレフタレート (PBT)、ナイロン 6 (PA6) 及びナイロン 66 (PA66) 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、フィブロネクチン及びビト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、PHEMA、PMEA 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体において、材料間でビトロネクチンの吸着挙動に差は認められなかった。汎用ポリマー (PET、PBT、PA6、PA66) において、アルブミンは結合定数が小さく、汎用ポリマー表面に最も吸着しにくかった。また、アルブミン及びフィブリノーゲンは、PET 及び PBT に比べて、PA6 及び PA66 により吸着しにくかった。一方、ビトロネクチンは結合定数が大きく、汎用ポリマー表面に最も吸着しやすかった。また、フィブロネクチン及びビトロネクチンは、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、ポリマーに対するアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動を動力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、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^{2,3}、それらの有用性が検証された⁴。しかし、高分子材料への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^{5,6}。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^{5,6}。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及び汎用ポリマー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等の吸着挙動を動力学的に解析した。

B. 研究方法

1. 試験材料

タンパク質の吸着挙動を評価する生体適合性ポリマーとして、poly(2-hydroxyethyl methacrylate)（PHEMA）、poly(2-methoxyethyl acrylate)（PMEA）及び組成比の異なるHEMA/MEAランダム共重合体

（HEMA/MEA=75/25；PHM7525、50/50；PHM5050及び25/75；PHM2575）（いずれも山形大学大学院理工学研究科・田中賢教授提供）を用いた。PHEMA及びPMEAの化学構造を図1に、PHEMA、PMEA及びHEMA/MEAランダム共重合の組成比、分子量及び多分散性指数を表1に示した¹⁷。さらに、比較対照のための汎用ポリマーとして、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリブチレンテレフタレート（PBT）、ナイロン6（PA6）及びナイロン66（PA66）（いずれも東レ株式会社製）を用いた。

また、ポリマーへの吸着挙動を解析するタンパク質として、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）並びに内因系血液凝固活性化リガンドであるフィブロネクチン（ヒト血漿由来）及びビトロネクチン（ヒト血漿由来）（いずれもSigma-Aldrich Co. LLC）を用いた。さらに、比較対照のためのタンパク質として、血清中に最も多く存在するタンパク質であるアルブミン（ヒト血清由来、Sigma-Aldrich Co. LLC）を用いた。

2. ポリマーコートQCMセンサーの作製

PHEMA、PMEA及びHEMA/MEAランダム共重合のコーティングは、QCMセンサー用の金電極付き水晶板をスピコートに設置し、ポリマーの10 mg/mL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。

PET、PBT、PA6及びPA66のコーティングは、金電極付き水晶板にポリマーの5 mg/mL 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）溶液5 µLを滴下し、過剰なHFIP溶液を取り除いた後、室温で十分に乾燥

させた。

ポリマーをコーティングした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。

3. タンパク質吸着実験

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 QN μ に設置し、センサーセルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 490 μ L 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 μ g/mL PBS 溶液 (終濃度 8、16、32、64 μ g/mL)、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの 50、100、200、400 μ g/mL PBS 溶液 (終濃度 1、2、4、8 μ g/mL) 並びにビトロネクチンの 12.5、25、50、100 μ g/mL PBS 溶液 (終濃度 0.25、0.5、1、2 μ g/mL) を 10 μ L 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、保存及び分注にはシリコナイズ処理されたチューブ及びチップ (株式会社アシスト) を用いた。

4. データ解析

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ッ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

アフィニングし、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⁶。

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

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

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

C. 研究結果

1. コーティング量

QCM センサーのポリマーコーティング前後における共振周波数の差から、QCM センサーへのポリマーの有効コーティング量を算出した。メタノール溶液 (10 mg/mL) からスピンコーティングした PHEMA 及び PMEA の有効コーティング量は、それぞれ 29.2 \pm 9.5 及び 3.19 \pm 0.90 μ g/cm² であった (n=4)。また、HFIP 溶液 (5 mg/mL) からキャストコーティングした PET、PBT、PA6 及び PA66 の有効コーティング量は、それぞれ 7.72 \pm 0.47、11.5 \pm 0.7、16.2 \pm 1.0 及び 18.4 \pm 0.7 μ g/cm² であった (n=3)。各ポリマーの有効コーティング量は異なっていたが、いずれのポリマーもセンサー表面を平滑にコーティングしており、センサー表面へのタンパク質の吸着には問題ないと判断した。

2. 吸着挙動

PHEMA 及び PMEA 表面に吸着するビトロネクチンの各濃度における QCM センサーグラムを図 2a 及び図 2b に示した。どちらの材料

もビトロネクチン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 2c 及び図 2d に示した。さらに、(1)、(2) 及び (3) 式から算出された PHEMA、PMEA 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ビト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 に示した。ビトロネクチンの結合定数及び結合速度定数は、材料間で差が認められなかった。

また、汎用ポリマー (PET、PBT、PA6 及び PA66) において、アルブミンの結合定数は、試験した 4 種類のタンパク質の中で最も小さかった。さらに、アルブミンの結合定数は、PET 及び PBT に比べて、PA6 及び PA66 の方が小さく、結合速度定数も同様な傾向を示した (表 3)。アルブミ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。また、フィブリノーゲンの結合定数も、PET 及び PBT に比べて、PA6 及び PA66 の方が小さく、結合速度定数も同様な傾向を示した (表 4)。アルブミンと同様に、フィブリノーゲ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。一方、フィブロネクチンの結合定数及び結合速度定数は、材料間で顕著な差が認められなかった (表 5)。また、ビトロネクチンの結合定数は、試験した 4 種類のタンパク質の中で最も大きかった。ビトロネクチンの結合定数及び結合速度定数も、材料間で顕著な差が認められなかった (表 6)。

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とが同じになり、巨視的にみて反応物と生成物の濃度変化が無くなった (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、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/cm^2 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⁾。また、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⁾。さらに、これらの血液適合性評価マーカー候補タンパク質を LC-MS/MS 装置を使用した SRM モードにより絶対定量を行った結果、FA7、FA9、C1s、フィブロネクチン及びビトロネクチンが血液適合性評価マーカーとして利用できることが確認された⁴⁾。FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 も評価マーカーとして利用可能であるが、一部の対照材料が生体適合性に優れた材料と近似する吸着挙動を示した⁴⁾。一方、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は、評価マーカーとして不適であることが判明した⁴⁾。

今回は、昨年度に実施した血液凝固因子のひとつであるフィブリノーゲン、内因系血液凝固活性化リガンドであるフィブロネクチン及び対照タンパク質であるアルブミンに加え⁸⁾、内因系血液凝固活性化リガンドであるビトロネクチンの PHEMA、PMEA 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体への吸着挙動を解析した。さらに、PHEMA 及び PMEA 等のように生体適合性及び血液適合性が高いことが知られているポリマーの対照として、血液適合性等が低いと考えられる汎用

ポリマー (PET、PBT、PA6 及び PA66) へのアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動を解析した。

PHEMA、PMEA 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体において、材料間でビトロネクチンの吸着挙動に差は認められなかった (表 2)。また、汎用ポリマーである PET、PBT、PA6 及び PA66 において、アルブミンは、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンに比べて結合定数が小さく、4 種類のタンパク質の中で汎用ポリマー表面に最も吸着しにくい (表 3)。一方、ビトロネクチンは、アルブミン、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大きく、4 種類のタンパク質の中で汎用ポリマー表面に最も吸着しやすい (表 6)。また、アルブミン (表 3) 及びフィブリノーゲン (表 4) の結合定数は、PET 及び PBT に比べて、PA6 及び PA66 の方が小さく、アルブミン及びフィブリノーゲンは、PET 及び PBT に比べて、PA6 及び PA66 により吸着しにくい。一方、フィブロネクチン (表 5) 及びビトロネクチン (表 6) は、材料間で吸着挙動に顕著な差は認められなかった

E. 結論

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、電極表面が血液適合性ポリマーである PHEMA、PMEA 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体 (PHM7525、PHM5050 及び PHM2575) 並びに汎用ポリマーである PET、PBT、PA6 及び PA66 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、フィブロネクチン及びビト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、PHEMA、PMEA及び組成比の異なるHEMA/MEAランダム共重合体において、材料間でビトロネクチンの吸着挙動に差は認められなかった。汎用ポリマーにおいて、アルブミンは結合定数が小さく、汎用ポリマー表面に最も吸着しにくかった。また、アルブミン及びフィブリノーゲンは、PET及びPBTに比べて、PA6及びPA66により吸着しにくかった。一方、ビトロネクチンは結合定数が大きく、汎用ポリマー表面に最も吸着しやすかった。また、フィブロネクチン及びビトロネクチンは、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、ポリマーに対するアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビト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) 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*, 102, 721-728 (2014)
- 2) 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*、134、731-735 (2014)
- 3) Tsuyoshi Kawakami, Kazuo Isama, Yoshiaki Ikarashi: Analysis of isothiazolinone preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 49, 1209-1217 (2014)
- 4) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明: イソチアゾリノン系防腐剤による接触皮膚炎—家庭用品に起因する症例を中心として—、*Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology*、8、147-161 (2014)
- 5) Yuji Haishima, Chie Hasegawa, Yusuke Nomura, Tsuyoshi Kawakami, Toshiyasu Yuba, Tomoko Shindo, Keisuke Sakaguchi, Takahiro Tanigawa, Kaori Inukai, Mika Takenouchi, Kazuo Isama, Atsuko Matsuoka, Shingo Niimi: Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102, 1809-1816 (2014)
- 6) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明: 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高速液体クロマトグラフィーを用いた確認試験に関する検討、*国立医薬品食品衛生研究所報告*、132、57-66 (2014)
- 7) Tsuyoshi Kawakami, Kazuo Isama, Yoshiaki Ikarashi: Analysis of 19 preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan by high performance liquid chromatography with photo diode array detector, *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2, 122 (2015)

8) Yuji Haishima, Tsuyoshi Kawakami, Chie Fukui, Akito Tanoue, Toshiyasu Yuba, Satoru Ozono, Hidehito Kumada, Kaoru Inoue, Tomomi Morikawa, Miwa Takahashi, Ayano Fujisawa, Kayo Yamazaki, Yusuke Nomura, Kazuo Isama, Yuichi Tei, Kumiko Ogawa, Shingo Niimi, Midori Yoshida: Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers, *Journal of Vinyl and Additive Technology*, in press

2. 学会発表

- 1) Kazuo Isama, Tsuyoshi Kawakami, Atsuko Miyajima: Characteristics and cytotoxic effects of nanoparticles when coexisting with metal salts, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (2014.9, Edinburgh)
- 2) 伊佐間和郎、河上強志、新見伸吾：血液適合性材料に吸着するタンパク質の動力学的解析、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11、江戸川区)
- 3) 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、鄭雄一、小川久美子、新見伸吾、吉田緑：新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11、江戸川区)
- 4) 齋島由二、河上強志、福井千恵、田上昭人、柚場俊康、向井智和、野村祐介、伊佐間和郎、新見伸吾：新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの性能評価、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11、江戸川区)

- 5) Atsuko Miyajima-Tabata, Tsuyoshi Kawakami, Kaoru Komoriya, Reiko Kato, Shingo Niimi, Kazuo Isama: Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells, The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3, San Diego)
- 6) 伊佐間和郎、河上強志、五十嵐良明：亜リン酸エステル系酸化防止剤の細胞毒性及び皮膚感作性、日本薬学会第 135 年会 (2015.3、神戸市)
- 7) 齋島由二、福井千恵、野村祐介、藤澤彩乃、山崎佳世、熊田秀文、井上薫、森川朋美、高橋美和、河上強志、伊佐間和郎、柚場俊康、宮崎謙一、鄭雄一、小川久美子、新見伸吾、吉田緑：PVC 製血液バッグに適用可能な新規可塑剤 NJC-NP の毒性評価、日本薬学会第 135 年会 (2015.3、神戸市)

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)
- 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) 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 25 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（2014）
- 5) 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）
- 6) 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）
- 7) 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）
- 8) 伊佐間和郎、河上強志：タンパク質吸着の動力学的解析、平成 25 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（2014）

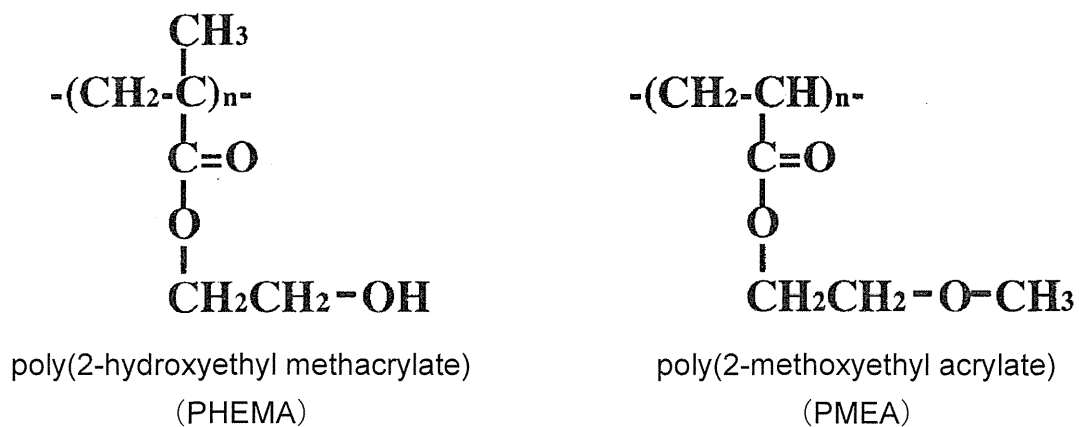


図1 PHEMA 及び PMEA の化学構造

表1 生体適合性ポリマーの組成比及び分子量⁷

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

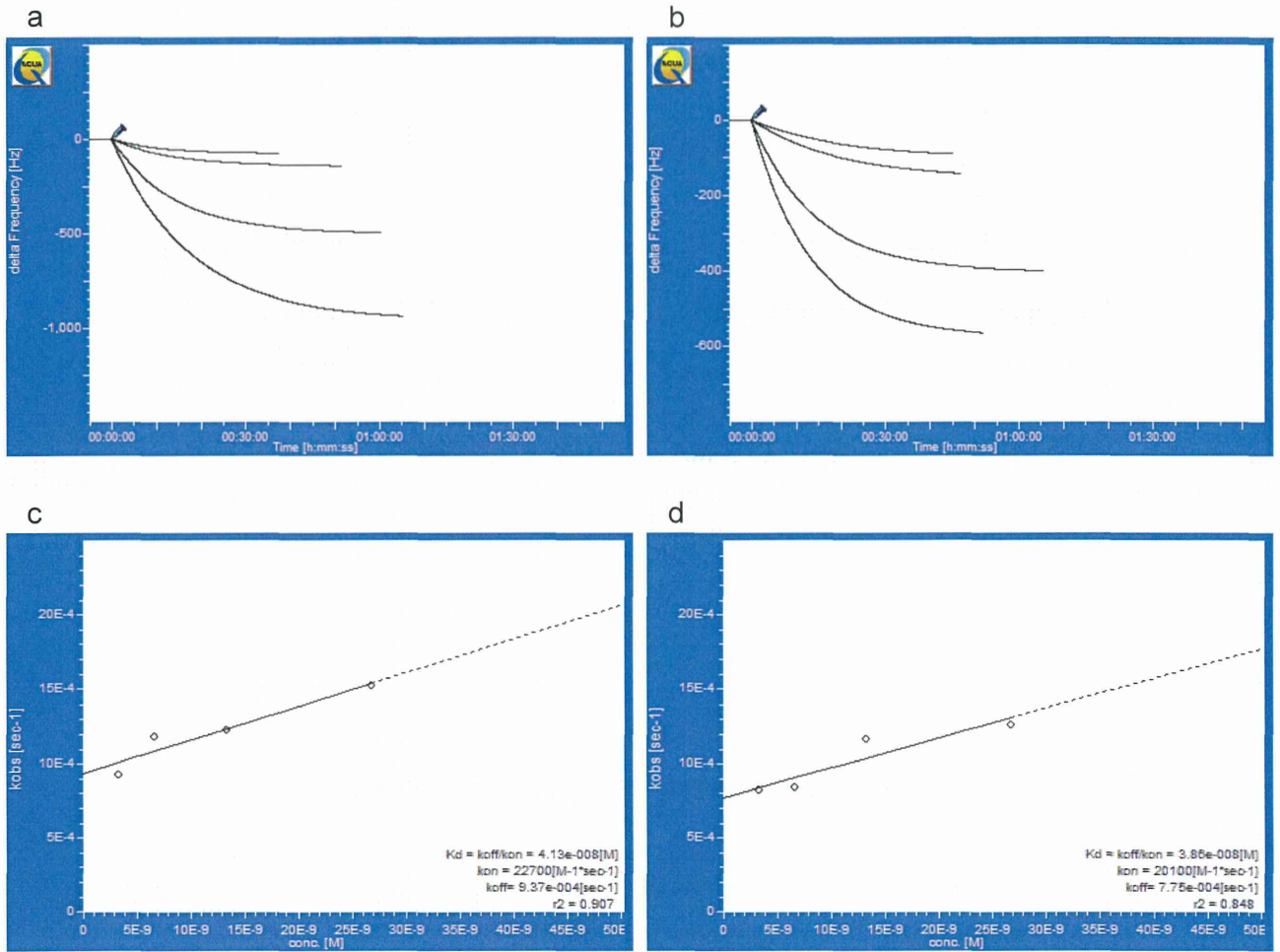


図2 PHEMA表面 (a, c) 及びPMEA表面 (b, d) に吸着するビトロネクチンのQCMセンサーグラム (a, b) 及び速度論的解析結果 (c, d)

表 2 生体適合性ポリマーへのビトロネクチンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of vitronectin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	2.42E+07	4.13E-08	2.27E+04	9.37E-04
PHM7525	2.46E+07	4.06E-08	2.00E+04	8.12E-04
PHM5050	2.53E+07	3.96E-08	2.11E+04	8.35E-04
PHM2575	2.62E+07	3.82E-08	2.07E+04	7.91E-04
PMEA	2.59E+07	3.86E-08	2.01E+04	7.75E-04

表 3 汎用ポリマーへのアルブミンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of albumin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PET	1.21E+08	8.27E-09	4.80E+04	3.97E-04
PBT	1.30E+08	7.69E-09	3.21E+04	2.47E-04
PA6	4.24E+07	2.36E-08	1.47E+04	3.47E-04
PA66	2.94E+07	3.40E-08	1.41E+04	4.79E-04

表 4 汎用ポリマーへのフィブリノーゲンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of fibrinogen			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PET	1.75E+09	5.70E-10	2.84E+05	1.62E-04
PBT	1.46E+09	6.87E-10	2.62E+05	1.80E-04
PA6	5.25E+08	1.91E-09	9.71E+04	1.85E-04
PA66	5.48E+08	1.82E-09	8.39E+04	1.53E-04

表5 汎用ポリマーへのフィブロネクチンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of fibronectin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PET	8.52E+08	1.17E-09	2.96E+05	3.47E-04
PBT	1.13E+09	8.83E-10	3.46E+05	3.06E-04
PA6	4.75E+09	2.11E-10	2.17E+05	4.57E-05
PA66	2.91E+09	3.43E-10	1.74E+05	5.97E-05

表6 汎用ポリマーへのビトロネクチンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of vitronectin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PET	4.10E+10	2.44E-11	1.25E+06	3.05E-05
PBT	4.71E+10	2.12E-11	1.49E+06	3.16E-05
PA6	2.07E+10	4.84E-11	9.21E+05	4.46E-05
PA66	1.77E+10	5.66E-11	9.14E+05	5.18E-05

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

材料表面近傍の水和状態とタンパク質吸着挙動解析

研究分担者 石原一彦 東京大学大学院工学系研究科・教授

研究要旨

タンパク質吸着現象には、材料表面における水分子のネットワーク構造(水和構造)と材料表面近傍で働く分子間相互作用(表面相互作用)が強く関与する。本研究では、材料表面におけるこれら二つの特性がタンパク質吸着挙動に果たす役割を定量的に解析することを目的とする。このような微細な特性を正確に解析するために、構造が明確であると同時に、広範囲にわたり界面科学的特性を制御できる高密度ポリマーブラシ構造を、ポリマー表面のモデルとして一貫して使用する。本年度は、ポリマーブラシ表面近傍の水分子の磁気緩和時間を様々な条件下で測定することで、より正確に表面水和構造を解析する系の確立を目指した。また、原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定により、ポリマーブラシ表面近傍で働く表面相互作用力を解析した。このような解析を通して、タンパク質吸着挙動を正確に理解することで、医療機器開発に関する規制環境の整備に貢献する。

A. 研究目的

バイオマテリアルが生体環境と接した際に誘起される細胞レベルの初期生体反応の多くに吸着タンパク質層の特性が関連している。つまり、材料表面における生体反応を高度に規定し、医療機器開発に関する規制環境を整備するためには、タンパク質吸着過程を正確に把握することが必要不可欠である。材料表面の吸着タンパク質層は、タンパク質が材料表面と直接相互作用して形成される単層吸着層と、単層吸着層を形成するタンパク質の変性等を引き金として起こる多層吸着層から形成される。このようなタンパク質吸着層の成り立ちから、タ

ンパク質吸着過程を正確に理解するためには、材料表面における吸着タンパク質の量、組成、分布、コンフォメーション、配向などの静的な特性評価はもとより、タンパク質の競争的吸着や吸着後の変性過程などに関わる動的な特性の解析が重要である。しかしながら、タンパク質吸着の動的特性は、静的特性の経時的変化として解析されることが多く、水を媒体として作用し、タンパク質の溶存状態での高次構造の維持、材料表面へのタンパク質吸着や吸着タンパク質のコンフォメーション変化に大きな影響を与える分子間相互作用の観点からは明確にされていない。