ウムの形成によって、高いアパタイト形成能を発揮したと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A: 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) Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A: 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).

2. 学会発表

1) Isama K, Kawakami T, Matsuoka A: Apatite Formation on Ca-Incorporated Ti-Zr Based Alloys in Simulated Body Fluid, The 9th World Biomaterials Congress (2012.3, Chengdu)

2) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したジルコニウムのイオン吸着挙動とアパタイト形成能、日本金属学会2012年秋期講演大会（2012.9、松山市）

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及びジルコニウムの擬似体液浸漬によるアパタイト形成、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012（2012.11、仙台市）

4) 河野健、澤田留美、伊佐間和郎、葩島由二、松岡厚子：チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012（2012.11、仙台市）

1) 葩島由二、河上強志、福井千恵、田上昭人、柚場俊康、伊佐間和郎、松岡厚子：DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発 –可塑剤溶出量と溶血性の関係について–、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012（2012.11、仙台市）

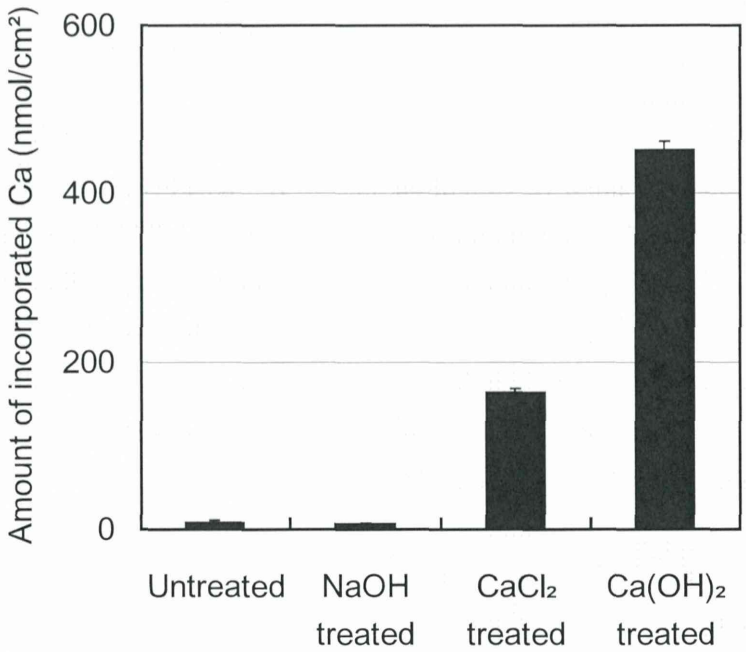

図 1　チタン表面へのカルシウム導入量

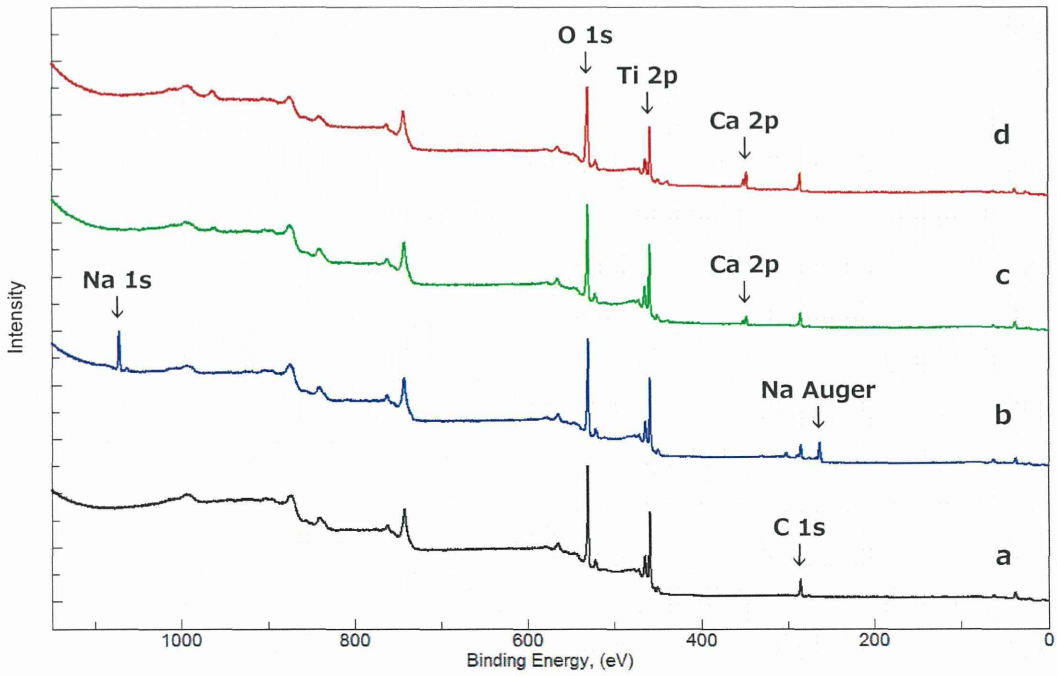

図 2　表面処理を施したチタンの XPS スペクトル

a: 未処理、b: NaOH 処理、c: $CaCl_2$ 処理、d: $Ca(OH)_2$ 処理

分担研究総合報告書
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学的に解析するため、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、いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は、汎用ポリマー（PET、PBT、PA6 及び PA66）より生体適合性ポリマー（PHEMA、PMEA 及び HEMA/MEA ランダム共重合）の方が小さく、解離定数及び解離速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きかった。特に、フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいて、これらの傾向は顕著であった。フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動からポリマーの血液適合性をスクリーニングできる可能性が示唆された。

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。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、それらの有用性が検証された。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。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。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。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ンコーターに設置し、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）の条件でスピンコートした後、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 QNμ 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）、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）並びにビトロネクチンの 12.5、25、50、100 μg/mL PBS 溶液（終濃度 0.25、0.5、1、2 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。

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（株式会社イニシアム）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。

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

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

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

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±9.5 及び 3.19±0.90 μg/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±0.47、11.5±0.7、16.2±1.0 及び 18.4±0.7 μg/cm² であった（n=3）。

2. 吸着挙動

被験ポリマーに吸着するアルブミン、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各濃度における QCM センサーグラムから速度論的解析によって得られた（1）の関係式から結合速度定数（k_{on}）及び解離速度定数（k_{off}）を算出し、さらに、（2）及び（3）式から結合定数（K_a）及び解離定数（K_d）を算出した（表 1～4）。

いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は、汎用ポリマー（PET、PBT、PA6 及び PA66）より生体適合性ポリマー（PHEMA、PMEA 及び HEMA/MEA ランダム共重合）の方が小さく、解離定数及び解離速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きかった。特に、フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいて、これらの傾向は顕著であった。

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。

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。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 XXIIα、VN、インテグリン α1、リポタンパク質（APOE）及びホスホリパーゼ D_5 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。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 β 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。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。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。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。

我々は、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、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挙動を解析した。

いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が小さく、これらのタンパク質は生体適合性ポリマーに吸着しにくい。一方、解離定数及び解離速度定数は汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きく、これらのタンパク質は生体適合性ポリマーから解離しやすい。フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいてこれらの傾向は顕著で、フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動から血液適合性をスクリーニングするこ

とができそうである。今後、ポリマーの種類をさらに増やして検証するとともに、血液適法性のスクリーニング法として利用するためには試験条件の最適化が求められる。

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学的に解析するため、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、いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が小さく、解離定数及び解離速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きかった。特に、フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいて、これらの傾向は顕著であった。フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動からポリマーの血液適合性をスクリーニングできる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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）

2) 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）

3) 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)

4) 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）

5) 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)

6) 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ー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）

7) 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)

8) 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）

9) 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)

10) 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) 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、葩島由二：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) 葩島由二、福井千恵、山﨑佳世、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ーラット精巣に及ぼす DOTP の影響評価ー、日本薬学会第 134 年会（2014.3、熊本市）

6) 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)

7) 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）

8) 葩島由二、福井千恵、山﨑佳世、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）

9) 葩島由二、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）

10) 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)

11) 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）

12) 葩島由二、福井千恵、野村祐介、藤澤彩乃、山﨑佳世、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）

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）

表１　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})
PHEMA	1.28E+06	7.84E-07	1.50E+03	1.18E-03
PHM7525	1.31E+06	7.64E-07	1.51E+03	1.15E-03
PHM5050	1.26E+06	7.93E-07	1.49E+03	1.18E-03
PHM2575	1.30E+06	7.68E-07	1.52E+03	1.17E-03
PMEA	1.33E+06	7.54E-07	1.51E+03	1.14E-03
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２　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})
PHEMA	2.49E+07	4.01E-08	2.37E+04	9.49E-04
PHM7525	2.23E+07	4.48E-08	2.26E+04	1.01E-03
PHM5050	2.20E+07	4.54E-08	2.29E+04	1.04E-03
PHM2575	2.01E+07	4.97E-08	2.18E+04	1.08E-03
PMEA	1.24E+07	8.05E-08	1.85E+04	1.49E-03
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 3　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})
PHEMA	6.02E+06	1.66E-07	1.78E+04	2.96E-03
PHM7525	5.71E+06	1.75E-07	1.74E+04	3.05E-03
PHM5050	5.23E+06	1.91E-07	1.60E+04	3.07E-03
PHM2575	5.34E+06	1.87E-07	1.65E+04	3.09E-03
PMEA	5.03E+06	1.99E-07	1.56E+04	3.09E-03
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 4　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
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

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）
分担研究報告書
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

研究分担者　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。表面特異的な水和構造を解析するため、マイクロオーダーのシリカ粒子を用いてナノオーダーの微小空間を構築し、そこに封入された水分子の特性を核磁気共鳴法により高い時間分解能で評価する方法論の確立を行った。これにより、シリカ粒子表面を覆ったポリマーブラシ層の特性に強く影響されたナノ間隙水の磁気緩和時間や自己拡散係数を定量的に評価した。また、分子間もしくは表面相互作用力を解析するため、様々な分子を固定化したプローブと材料表面間にナノニュートンオーダーで働く相互作用力を原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定により定量する方法論の確立を行った。これにより、様々な分子と材料表面間に働く相互作用力が、タンパク質吸着挙動に与える影響について評価した。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。

そこで本研究では、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(表面相互作用力)が、タンパク質吸着挙動に与える影響を定量的に解析することを目的とする。

材料表面における水和構造や表面相互作用力は非常に微細である。つまり、これらを定量的に分析するためには構造明確な表面が必要不可欠である。本研究では、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。

表面特異的な水和構造を解析するため、マイクロオーダーのシリカ粒子を用いてナノオーダーの微小空間を構築し、そこに封入された水分子の特性を核磁気共鳴法により高い時間分解能で評価する方法論の確立を行った。これにより、シリカ粒子表面を覆ったポリマーブラシ層の特性に強く影響されたナノ間隙水の磁気緩和時間や自己拡散係数を定量的に評価した。また、分子間もしくは表面相互作用力を解析するため、現在界面科学の研究分野で大きな発展を遂げているコロイドプローブ科学に着目し、様々な分子を固定化したプローブと材料表面間にナノニュートンオーダーで働く相互作用力を原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定により定量する方法論の確立を行った。これにより、様々な分子と材料表面間に働く相互作用力が、タンパク質吸着挙動に与える影響について評価した。

B．研究方法

1. ポリマーブラシ表面の構築

シリコン基板、シリカ粒子(直径：2、10または 20 μm)および金表面に原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始基を固定した後、表面開始型 ATRP (SI-ATRP)法を用いて、図 1 に示すポリマーブラシ構造を構築した。ポリマーブラシ構造を構築する際のモノマー濃度とフリー重合開始剤の比を制御することで、種々の分子量を有するグラフト鎖からなるポリマー層を表面に構築した。ここで、双性イオン性モノマーとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) (ホスホベタイン型)、*N*-methacryloyloxyethyl *N,N*-dimethyl ammonium-α-*N*-methyl carboxylate (CBMA) (カルボキシベタイン型)および [2-(methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide (SBMA) (スルホベタイン型)を、非電解質親水性モノマーとして 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) (ヒドロキシル基)および oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (mOEGMA) (オリゴエチレングリコール鎖)を、カチオン性モノマーとして、2-trimethylammoniumethyl methacrylate (TMAEMA) (トリメチルアンモニウム基)を、アニオン性モノマーとして、3-sulfopropyl methacrylate (SPMA) (スルホプロピル基)を、疎水性モノマーとして、*n*-butyl methacrylate (BMA) (ブチル基)をそれぞれ用いた。

作製したポリマーブラシ表面の物理化学的な構造を X 線光電子分光(XPS)測定、原子間力顕微鏡(AFM)および分光エリプソメーターにより評価した。水中の表面特性評

価として、動的接触角測定および表面ゼータ電位測定(10 mmol/L の NaCl 水溶液中)を行った。

2. 水和構造解析

様々な膜厚のポリマーブラシ構造を構築したシリカ粒子(直径：2 または 10 μm)を NMR 管に詰めた後、脱気した純水を加え、ポリマーブラシ層を水和させた。サンプルによっては 3500 rpm で 10 分間遠心し、シリカ粒子を充填させた。このように調製した NMR チューブを NMR 装置に設置し、37°C に保持した後、サンプルに含まれる水分子のスピン－格子緩和時間(T1)および自己拡散係数(D)を測定した。

3. ポリマーブラシ表面近傍の表面相互作用力測定

図 1 に示したポリマーブラシ層のうち、poly(MPC)、poly(TMAEMA)、poly(SPMA)および poly(BMA)ブラシ表面を構築した直径 20 μm のシリカ粒子をプローブレスカンチレバーの先端に手動で固定化した。カンチレバー先端に存在するポリマーブラシ層と同じポリマーブラシ層をシリコン基板表面に構築し、様々な塩濃度の水環境下において両者の間に生じるフォースカーブ曲線を取得した。

4. タンパク質吸着量の定量

水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)を用いて、ポリマーブラシ表面に対するタンパク質吸着量を定量した。ポリマーブラシ層を構築した金センサー基板を QCM-D 装置に設置後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH 7.4)を用いてベースラインを測定した。45 mg/mL の濃度に調製されたウシ血清アルブミン(BSA)の PBS 溶液を 30 分間接触させた後、センサー表面を PBS で洗浄した。タンパク質溶液との接触前後の振動数変化をタンパク質吸着量とし、「タンパク質吸着量(ng/cm^2) = 17.7 x 振動数変化(Hz)」の変換式を用いて定量的にタンパク質吸着量を評価した。

5. 官能基との直接的な相互作用

3 に示した方法により、プローブレスカンチレバーの先端に直径が 20 μm の未修飾シリカ粒子を手動で固定化し、そこに接着層としてクロムを 3.0 nm、続いて金薄膜を 27 nm スパッタした。同カンチレバー表面に、11-mercapto-undecanoic acid、11-amino-1-undecanethiol (hydrochloride)、および 1-dodecanethiol のエタノール溶液(1.0 mmol/L)を用いて、それぞれカルボキシル基、アミノ基およびメチル基末端の自己組織化単分子(SAM)膜を形成した。室温の PBS 中におけるフォースカーブ測定により、各ポリマーブラシ表面に対する離脱時のフォースカーブを取得した。

6. タンパク質との直接的／間接的な相互作用評価

各ポリマーブラシ表面に関して、タンパク質との直接的／間接的な相互作用を評価した。タンパク質として、ウシ血清アルブミン(BSA)およびニワトリ卵白由来リゾチーム(Lys)を使用し、これらのタンパク質を化学的に固定化したカンチレバー(曲率半径：50 nm)を作製した。室温の PBS 中におけるフォースカーブ測定により、各ポリ

マーブラシ表面に対する接近および離脱時のフォースカーブを取得した。

（倫理面への配慮）

本研究は、合成高分子やタンパク質を使用するものであるため、倫理面に関して特段の配慮は不要であると判断した。

C．研究結果およびD．考察

1. ポリマーブラシ表面の構造および特性

得られたポリマーブラシ表面のXPSチャートに、各モノマーユニットに特異的な元素ピークが検出された。また、ポリマーブラシ表面は乾燥状態で比較的小さい凹凸構造であり、表面粗さの指標であるRMS値は1.0 nm以下であった。表1に示すように、エリプソメトリーによる乾燥膜厚解析から、各ポリマーブラシ表面のグラフト密度はすべて0.10 chains/nm^{2}以上であった。グラフト密度とポリマー鎖の断面積から概算した表面被覆率は、すべての表面において30%を超え、非常に高い値とあった。これらの結果は、作製されたポリマーブラシ基板が高密度領域にあることを示した。

表1には、膜厚が5.0 nm程度の各ポリマーブラシ表面の動的接触角および表面電位も併記した。Poly(BMA)を除くポリマーブラシ基板の後退接触角は低い値を示し、水中で高い親水性を示すことがわかった。表面電位に関しては、カチオン性のpoly(TMAEMA)ブラシ層が40 mVを超える表面電位を示し、アニオン性のpoly(SPMA)ブラシ層は強い負電荷を持つ表面であった。一方、非イオン性およびスルホベタイン構造のポリマーブラシ表面が-10 mV程度と多少アニオン性であった。弱酸ー弱塩基の組み合わせからなるホスホベタインやカルボキシベタイン構造を有するポリマーブラシ表面はほぼ中性であった。

このように、高密度ポリマーブラシ層により、均一な構造を有し、ポリマー鎖の配置がナノメートルオーダーで明確である表面を構築した。また、様々な化学構造を有するグラフト鎖を配置することで、濡れ性や表面電位などに代表される界面科学的な表面特性を広範囲に制御した。

2. 水和構造解析

図2に膜厚が5.0 nm程度のポリマーブラシ層近傍の水分子の自己拡散定数を示す。水分子の運動性に対応する自己拡散係数は、カチオン性のpoly(TMAEMA)ブラシ表面およびアニオン性のpoly(SPMA)ブラシ表面のイオン性ポリマーブラシ表面で非常に小さい値となった。つまり、これらの表面では水分子がポリマー鎖と強く相互作用し、その運動性が抑制されていることが示唆された。非イオン性のpoly(HEMA)ブラシ表面の水分子は、今回のポリマーブラシ表面の中で最大の自己拡散係数を示した。ここで、poly(HEMA)ブラシ表面は、そのポリマー鎖が非水溶性であるという点で他の水溶性ポリマーブラシ表面と異なる。このため、poly(HMEA)ブラシ近傍の水和様式は他と異なると考えられる。水溶性ポリマーブラシ表面の中で、オリゴエチレングリコール鎖を有するpoly(mOEGMA)ブラシ表面や双性イオン性のポリマーブラシ表面の水分子は、大きな自己拡散定数を有しており、水分子が高い運動性を有することがわかった。これは適度な水素結合性水和やイオン性水和、疎水性水和が影響を与えてい

ると考えられる。

間隙に封入された水は、ポリマーブラシ層内部の水、ポリマーブラシ層最表面付近の水、およびポリマーブラシ層と相互作用していない水からなると考えられる。重合度が 50 から 200 の範囲で作製したポリマーブラシ層の厚さは 5 から 20 nm 程度であるが、直径が 10 μm のシリカ粒子が形成する間隙のサイズは最大で 800 nm である。これは、間隙内に封入された水分子の大部分が表面に存在するポリマー鎖と相互作用しない自由水であることを意味する。このため、現状では 3500 ms 程度の T1 値を有する純水の影響を強く受け、T1 値が大きく見積もられる可能性がある。このような事態を解決するため、シリカ粒子の直径を変化させたり、遠心を利用しシリカ粒子のパッキングを密にしたり、またはブラシ層の厚さを変化させたりするなどの改変が今後必要であると考えられる。

3. ポリマーブラシ表面近傍の表面相互作用力測定

図 3 に、純水およびイオン強度が異なる PBS (1.5 mmol/L および 150 mmol/L)中において、同種のポリマーブラシ表面の接近時のフォースカーブを示す。ただし、poly(BMA)表面に関しては、接近時および離脱時のフォースカーブを示す。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面およびアニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面では、純水中において 100 nm 以上の距離から強い斥力が観測され、溶液のイオン強度の増加に伴い斥力の強さと伝播距離が低下した。これは、これらの斥力が主として静電的な力、つまり静電的相互作用に由来するものであることを示している。また、疎水性の側鎖を有する poly(BMA)ブラシ表面では、純水中において接近時には力が観測されなかったが、接触後、離脱時のみに強い引力が観測された。この引力は水中で疎水性表面間に働く疎水性相互作用に起因するものであると考えられる。また、図 4 に示す離脱時のフォースカーブから、カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面およびアニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)表面には、poly(BMA)ブラシ層で検出された離脱時の強い引力が検出されなかった。一方、双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC)ブラシ表面では、このような特徴を示すフォースカーブが観察されなかった。すなわち、静電的・疎水的な相互作用に由来する力は全く観測されなかった。

これらの結果から、カチオン性およびアニオン性ポリマーブラシ表面には、静電的相互作用のみが、疎水性ポリマーブラシ表面には疎水性相互作用のみが働き、双性イオン性ポリマーブラシ表面にはこのような相互作用が全く働いていないことが明らかとなった。

4. タンパク質吸着量

図 5 に、ポリマーブラシ表面への BSA の吸着量の定量結果を示す。双性イオン型ポリマーブラシ表面には 20 から 40 ng/cm^2 程度のタンパク質が吸着した。非イオン型ポリマーブラシ表面の中で、poly(HEMA)ブラシ表面には 80 ng/cm^2 程度のタンパク質が吸着したが、poly(mOEGMA)ブラシ表面は 20 ng/cm^2 程度のタンパク質吸着量であった。BSA の理論単層吸着量は 270

ng/cm^{2}程度である。このことから、双性イオン性および非イオン性ポリマーブラシ表面は BSA の吸着が単層以下に抑制されたことがわかった。一方、イオン性ポリマーブラシ表面のタンパク質吸着量は、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面で 290 ng/cm^{2}程度であり、カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面で 1200 ng/cm^{2}に達した。つまりアニオン性表面には単層の、カチオン性表面には多層のタンパク質吸着層が形成された。BSA が生理条件下で負に帯電していることから、カチオン性ポリマーブラシ表面との静電的な相互作用により多層吸着層が形成されたと考えられる。

5. タンパク質との直接的／間接的な相互作用評価

図 6 にポリマーブラシ表面とタンパク質との間の代表的なフォースカーブを、図 7 に離脱時のフォースカーブから得られる直接的相互作用力を示す。ここでは、生理条件下でそれぞれ全体として、負の正味電荷を有するタンパク質である BSA に加えて、正の正味電荷を有する Lys を用いた。図 7 に示すように、ポリマーブラシ表面とタンパク質との相互作用は、その組み合わせにより大きく異なった。BSA との相互作用はカチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面で最大であった。これは、poly(TMAEMA)表面の正電荷と BSA の有する負電荷との間の静電的な引力に起因すると考えられる。また、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面に対する BSA の相互作用は小さかった。これは、負電荷同士の斥力に起因すると考えられる。一方、正の正味電荷を有する Lys は、疎水性の側鎖およびアニオン性の電位を有する poly(BMA)ブラシ表面と強く相互作用した。しかしながら、Lys と poly(SPMA)との相互作用は非常に小さかった。この理由は現時点では明らかではないが、塩強度の強い PBS 中にて、溶液中に存在するイオンにより静電的な相互作用が遮蔽されていることが考えられる。タンパク質の正味電荷に関わらず、双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC)ブラシ表面はタンパク質との相互作用が非常に小さかった。

双性イオン性および非イオン性ポリマーブラシ表面に関して、BSA の吸着量および吸着力の関係を図 8 に示す。図 8 より、タンパク質吸着力の減少に伴い、タンパク質吸着量が減少した。つまり、単層以下の吸着量は、表面とタンパク質との直接的な相互作用により決まることが示唆された。一方、多層吸着層が形成したイオン性表面は図 8 に示す相関から外れた。これは、吸着力が表面との直接的な相互作用を評価するのに対して、吸着量は表面に吸着したすべてのタンパク質を評価することに起因すると考えられる。これらに関してより詳細かつ系統的な解析を行うためには、タンパク質をあらかじめ吸着させた基板とタンパク質との相互作用解析などが必要不可欠である。

図 6 に示すフォースカーブのうち、接近時のフォースカーブに着目すると、ほとんどの組み合わせで、タンパク質とポリマーブラシ表面との間に引力を観測することはなかった。すなわち、これらの表面における静電的あるいは疎水的な相互作用はタンパク質を引き付ける駆動力としてではなく、

接触後の離脱を妨げる力として働いていることが明らかとなった。

6. ポリマーブラシ表面と官能基との直接的相互作用

様々な官能基により修飾されたプローブを用いてフォースカーブ測定を行い、ポリマーブラシ表面と官能基との間に働く相互作用を定量的に評価した(図 9)。選択した官能基はカルボキシル(COOH)基、アミノ(NH_2)基およびメチル(CH_3)基であり、これらはタンパク質中に多く存在する代表的な官能基であると同時に、それぞれアニオン性、カチオン性および疎水性の特性を有するため、静電的相互作用や疎水性相互作用の指標になると考えられる。双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC)ブラシ表面はいずれの官能基との相互作用も極めて小さかった。この結果から、poly(MPC)ブラシ表面では静電的相互作用や疎水性相互作用に由来する力がほとんど働かないことが示唆される。また、水中の気泡の接触角および表面電位から、これらの表面が水環境下において高い親水性かつ電気的に中性を有する表面であったこととも一致する。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面はカルボキシル基との特に強い相互作用を示した。これは、poly(TMAEMA)の側鎖に存在する正電荷と、解離したカルボキシル基(COO^-)の負電荷との間に強い静電的引力が働いていることを示す。疎水性の側鎖を有する poly(BMA)ブラシ表面はメチル基およびアミノ基との強い相互作用を示した。メチル基との強い相互作用は、水中において働く疎水性相互作用に由来すると考えられる。同時に表 1 に示したように、poly(BMA)ブラシ表面はアニオン性であったため、プロトン化したアミノ基(NH_3^+)の正の電荷との間の静電的相互作用に由来する力が働いたと考えられる。一方で、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面は PBS 中ではいずれの官能基との相互作用も示さなかった。しかしながら、純水中においては poly(SPMA)ブラシ表面とアミノ基との強い相互作用が観測された。このため、poly(SPMA)表面では、塩強度の強い PBS 中において、静電的相互作用が静電遮蔽の効果を受けているものと考えられる。以上のように、様々な官能基で修飾されたプローブを用いたフォースカーブ測定により、ポリマーブラシ表面に働く分子間相互作用の一部を定量的に明らかとした。

バイオマテリアル表面における官能基レベルの相互作用が、タンパク質との相互作用に与える影響を定量的に評価することは、タンパク質吸着挙動のさらなる理解へと繋がる。図 10 に、ポリマーブラシ表面におけるタンパク質の相互作用と官能基との相互作用の総和との関係を示す。図 10 より、官能基との相互作用の総和が小さいポリマーブラシ表面と大きいポリマーブラシ表面に分けることができる。官能基との相互作用の総和が小さいポリマーブラシ表面は、タンパク質の正味電荷によらず、タンパク質との相互作用が小さいことが示された。一方、官能基との相互作用の総和が大きいポリマーブラシ表面では、同等の総和であってもポリマーブラシ表面とタンパク質との組み合わせにより、その関係が大きく変化した。つまり、負電荷の乖離カルボキシル(COO^-)基と強く相互作用する poly(TMAEMA)ブラシ表面は、負の正味電

荷を有するBSAと強く相互作用し、疎水性のメチル基および正電荷のプロトン化アミノ(NH_3^+)基と強く相互作用するpoly(BMA)ブラシ表面は、正の正味電荷を有するLysと相互作用した。これは、突出した相互作用を有する官能基との相互作用が、タンパク質との相互作用を決定することを示唆する結果である。このような結果から、タンパク質との非特異的な相互作用を排除するためには、官能基レベルの相互作用を回避する必要があることが示された。

E．結論

構造明確かつ広範囲にわたる表面特性を有するポリマーブラシ構造を用いることで、表面特異的な水和構造および表面相互作用力がタンパク質吸着挙動に与える影響を解析した。イオン性のポリマーブラシ表面には静電的相互作用のみが、疎水性のポリマーブラシ表面には疎水性相互作用のみが働き、双性イオン性ポリマーブラシ表面にはこのような相互作用が働いていないことが明らかとなった。加えて、イオン性ポリマーブラシ表面近傍の水分子はその運動性が著しく抑制されていることがわかった。表面に働く相互作用は、タンパク質を引き付ける駆動力としてではなく、接触後の離脱を妨げる力として働いていることが明らかとなった。また、官能基レベルの相互作用が、タンパク質との相互作用に直結していることがわかった。さらに、タンパク質と表面との間に働く相互作用がタンパク質の吸着量と相関することが示された。以上より、タンパク質の離脱時の分子間相互作用を誘起しない表面の設計がタンパク質吸着の抑制に重要であることが定量的に明らかとなった。

F．研究発表

1. 論文発表

○Kazuomi Inoue, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Effects of dynamics of water molecules at hydrophilic polymer brush surfaces on protein adsorption behavior", Trans. Mater. Res. Soc. Jpn. 37(3) 333-336 (2012).

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Quantitative Evaluation of Interaction Force between Functional Groups in Protein and Polymer Brush Surfaces", Langmuir, 30, 2745-2751, (2014) (dx.doi.org/10.1021/la404981k).

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Nano-scale Molecular Interaction Force Measurement for Analysis of Protein Adsorption on the Surfaces", Trans. Mat. Res. Soc. Japan 39[2] 185-188 (2014).

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Molecular Interaction Forces Generated during the Protein Adsorption to Well-defined Polymer Brush Surfaces", Langmuir, in press (2015) (dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00351).

2. 学会発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Interaction forces related to protein adsorption on polymer brush surfaces", The Society For Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition: Biomaterials Revolution, Boston, USA, 2013/4/10-13.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「種々の力が作用するポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着挙動」、第 62 回高分子学会年次大会、京都、2013/5/29-31.
○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質非吸着を実現する表面相互作用力の定量解析」、第 62 回高分子討論会、金沢、2013/9/11-13.
○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Nano-force Analysis for Understanding Protein-Materials Interactions", 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013, Tokyo, Japan, 2013/10/8-10.
○井上祐貴、坂田翔、石原一彦、「タンパク質吸着の AFM ナノフォース解析」、第 35 回バイオマテリアル学会大会、東京、2013/11/25-26.
○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着の理解を目指したナノスケールの相互作用力解析手法の確立」、第 23 回日本 MRS 年次大会、横浜、2013/12/9-11.
○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Surface Interaction Forces Governing Protein Adsorption Analyzed by Direct Force Measurement", The Society For Biomaterials 2014 Annual Meeting and Exposition: Pioneering the Future of Biomaterials, Denver, USA, 2014/4/16-19.
○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「表面で観測される力の解析に基づくタンパク質非吸着表面の創製」、第 63 回高分子学会年次大会、名古屋、2014/5/28-30.
○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着における分子間相互作用力の役割」、第 43 回医用高分子シンポジウム、東京、2014/7/28-29.
○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「ポリマー表面における分子間相互作用力の精密解析とタンパク質吸着プロセスの理解」、第 63 回高分子討論会、長崎、2014/9/24-26.
○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「種々の分子間相互作用力に基づくタンパク質吸着プロセスの理解」、第 36 回バイオマテリアル学会大会、東京、2014/11/17-18.
○井上祐貴、石原一彦、「マテリアル表面近傍の水和構造がタンパク質との相互作用に与える影響」、第 36 回バイオマテリアル学会大会、東京、2014/11/17-18.
○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Analysis of protein adsorption force generated at polymer surfaces for designing non-biofouling surfaces", The 10th International Polymer Conference, Tsukuba, Japan, 2014/12/2-5.
○Kazuhiko Ishihara, Sho Sakata, Yuuki Inoue, "Nanoforce measurements for understanding protein adsorption at the biocompatible surface", 8th International Symposium on Nanomedicine, Matsuyama, Japan, 2014/12/4-6.
○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着プロセスの理解を目指した分子間相互作用力の解析」、第 24 回日本 MRS 年次大会、横浜、2014/12/10-12.

G．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

なし