

総合分担研究報告書

平成 24-26 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

分担研究者 齋島 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	比留間 瞳	国立医薬品食品衛生研究所
中岡 竜介	国立医薬品食品衛生研究所	柚場 俊康	川澄化学工業株式会社
野村 祐介	国立医薬品食品衛生研究所	棚橋 一裕	東レ先端材料研究所
福井 千恵	国立医薬品食品衛生研究所		

研究要旨

本研究では、医用材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から評価する新たな手法の開発を目指し、血液適合性の異なる種々の材料を対象としたプロテオミクス解析により、血液適合性評価マーカ蛋白質の探索及び検証実験を行った。

平成 24 年度は、血液適合性の異なる 23 種類の材料（チタン材料 6 種類、PVP/PSF 材料 6 種類、一般プラスチック 6 種類、MEA/HEMA 系材料 5 種類）に吸着する血漿蛋白質の網羅的プロテオミクス解析を行い、血液適合性評価マーカ候補として、FA7、FA9、FA12、C1r、C1s、C3、C5、FHR1、FIBB、FINC、VTNC、GPX3 及び PLD5 を選定した。平成 25 年度は、これらの候補蛋白質の有用性を標的プロテオミクス解析により検証し、FA7、FA9、C1s、C1r、C3、FINC、VTNC 及び FHR1 が血液適合性評価マーカとして利用できる可能性を見出した。平成 26 年度は、検証データを収集する一環として、DLC 系ステント材料の血液適合性を網羅的プロテオミクス解析に評価した結果、過去に報告された invitro 試験、動物実験及び臨床評価と一致する成績が得られた。また、新たに合成された生体適合高分子である PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A の血液適合性も蛋白質吸着特性から予測・評価できることが示唆される等、本研究において得られた成績は、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を検証する上で非常に有益な情報となった。

本研究により、医用材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿蛋白質の種類及び量から予測・評価できることが示唆された。今後、標的プロテオミクス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（n=10）を行い、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を更に検証する。また、本評価法を公定法として広めるため、ELISA 等の簡易な測定系を利用した試験法の開発を目指す。

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。そこで我々は、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、各種材料表面への蛋白質吸着挙動と血液適合性及び骨親和性の相関性について検討してきた。対照となる一般プラスチック材料(C-PET, CTA, PS, PTFE, PSF, UHMWPE)及び種々の化学処理を施したチタン材料への血漿蛋白質の吸着挙動解析は過去に実施した一連の試験において終了している。

本研究では、材料表面への蛋白質吸着特性と血液適合性の相関評価に係る基礎データを更に集積し、新たな試験法の提案に繋げるため、血液適合性の異なる種々の材料を対象としたプロテオミクス解析により、血液適合性評価マーカ

蛋白質の探索及び検証実験を行った。

B. 研究方法

(1)材料

高分子材料として、PVP含量の異なるPSFシート(PVP含量:0, 1, 5, 9, 20, 33 wt%)、PHEMA、PMEA、PTHFVE、PEOEVE、PMe3A及びMEA/HEMAランダム共重合体(MEA/HEMA=25/75, 50/50, 75/25)を使用した。

血管ステント用金属材料としては、SUS、SUS/DLC、SUS/Si-DLC、SUS/30%F/DLC、Co-Cr及びNi-Tiを使用した。Ni-Tiは円筒状、Co-Crは半円筒状、その他の材料はプレート状であり、いずれの材料も表面粗さを統一した。

(3)PCシートの作製

メタノールで洗浄したPCシート(33 mm、厚さ0.1 mm)をPTFEメンブランフィルタを介してスピンコートに固定し、4000 rpm回転下、PHEMA、PMEA、PTHFVE、PEOEVE、PMe3A又はMEA/HEMAランダム共重合体のメタノール溶液(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。

(4)表面解析

液滴法及び水中気泡法による静的接触角はERMA接触角測定器G-1-1000を用いて測定した。XPS解析は、島津製ESCA3200を用いて行った。SEM画像は試料をAu被覆した後、JEOL JSM-5800LV走査型電子顕微鏡を用いて取得した。

(5)血漿蛋白質の吸着と回収

各種材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に37℃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、アプロサイエンス社製 XL-Bradford 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。

(6) ペプチドの調製

常法に従って還元及びアルキル化した蛋白質試料を含む細胞溶解液に 50 mM NH_4HCO_3 、プロメガ社製 Protease Max Surfactant 及び Trypsin Gold を添加し、37 °C で 4 時間インキュベーションした後、10% TFA 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) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析に供するまで 4 °C で保存した。

TMT 標識ペプチドは、Thermo Scientific 社製 TMT 6plex 試薬を用いて常法に従って調製した。

(7) 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。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。

(8) LC-MS/MS 分析

質量分析計として、Thermo Scientific 社製 LTQ/Orbitrap (非標識ペプチド/網羅的解析) 及び Q-Exactive (TMT 標識ペプチド/網羅的解析) 及

び TSQ Vantage (SRM 定量解析) を使用した。試料のイオン化は ESI positive ion mode により行った。

Nano-LC としては、HTC-PAL オートサンプラーを装備した 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。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、一分析当たりの溶出時間は 150 分 (グラジエント条件: 0-40%B/125 min 40-55%B/130 min 100%B/135 min 100%B/140 min 0%B/150 min) とした。

(9) 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、コリジョンエネルギー及び S-lens 電圧を設定した。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。

(10) 蛋白質の同定、比較定量及び絶対定量

蛋白質の同定及び TMT 標識体の比較定量解析は、Thermo Scientific 社製蛋白質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェアを用いて行った。検索エンジン及びデータベースとしては、それぞれ Mascot 及び UniProtKB/Swiss-Prot を利用した。非標識条件下における蛋白質の多変量解析はメディカルプロテオスコープ社製 i-RUBY ソフトウェアを用いて行った。絶対定量解析は、Xcalibur QUAN Browser を用いて行った。

C . 研究結果

(1)高分子コーティング PC シートの検証

PBS 浸漬、培地浸漬及び未浸漬の各種 PC シートの表面特性を接触角測定、XPS 解析及び SEM 解析により評価した結果、いずれの高分子材料ともに良好にコーティングされており、PBS 及び培地浸漬後も剥離しないことが確認された。

(2)血液適合性評価マーカ候補の選定

PVP 含有 PSF、PMEA、PHEMA 及び MEA/HEMA ランダム共重合体への蛋白質吸着挙動を解析し、過去に実施した対照材料（一般プラスチック 6 種類、化学処理チタン 6 種類）への蛋白質の吸着挙動を踏まえて比較検討した。その結果、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 が血液適合性評価マーカとして利用できることが示唆された。

(2)血液適合性評価マーカの検証

2-1. 標的プロテオミクスによる検証

血液適合性評価マーカ候補を対象とした SRM 解析を行った結果、PMEA、PHEMA 及び MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC、VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っていた。最も良好な血液適合性を有すると思われる PMEA を基準とした場合は、C1r、C3、FHR1 が有用な評価マーカとなり得ることが示唆された。一方、FA12、FIBB、C5、GPX3、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示唆された。

2-2. 金属ステント材料の蛋白質吸着特性

対照として使用した SUS と比較して、SUS/Si-DLC は C1 系補体と一部の抗体の吸着量が半減していたが、その他の血液凝固関連蛋白質の吸着挙動は SUS と同等であった。SUS/DLC には、

FIBB 及び FIBG が有意に吸着したが、その他の蛋白質群の吸着量は全体的に SUS を下回ることが確認された。一方、SUS/30%F/DLC、Co-Cr、Ni-Ti への血液凝固関連蛋白質の吸着量はいずれも低値であり、特に SUS/30%F/DLC 及び Ni-Ti では、C3、C4、CFAB、VTNC、VWF 等の吸着が顕著に抑制されていた。これらの蛋白質吸着特性から判定した各材料の血液適合性は SUS/30%F/DLC=Ni-Ti>Co-Cr>SUS/DLC>SUS/Si-DLC>SUS の順になることが明らかになった。

(3)新規高分子材料の血液適合性評価への応用

対照として使用した UHMWPE と比較して、いずれの高分子材料もアルブミン吸着量は低下していたが、PMe3A には補体、FINC 及び抗体が有意に吸着することが判明した。一方、PMEA と PTHFVE への血液凝固関連蛋白質の吸着量は全体的に少なく、血液適合性評価マーカとして着目している C1r、C1s、C3、FINC 及び VTNC ともに低値を示した。UHMWPE と比較して、PHEMA では FINC 及び ITA1 の吸着が 1/2 程度に抑制されていたが、補体及び抗体の中には有意に濃縮される蛋白質が散見された。PEOEVE の場合、C1q、C1s、C9、ITA1 及び VTNC のほか、フィブリノゲン、FINC 及び抗体の吸着量が低下する傾向が認められた。これらの蛋白質吸着挙動から判定した各高分子材料の血液適合性は PMEA=PTHFVE>>PEOEVE>PHEMA>UHMWPE>>PMe3A の順になることが明らかになった。

D . 考 察

本研究では、医用材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から予測・評価する試験系の確立を目指し、23 種類の材料表面に吸着する血漿蛋白質を試料として、網羅的プロテオミクス解析による血液適合性評価マーカ候補蛋白質の検索と標的プロテオミクスによる評価マーカの検証を行った。また、検証実験の一環として、金属ステント材料の血液適合性を我々が選定した血液適

合性評価マーカ蛋白質の吸着特性から予測し、得られた成績を過去に報告された *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果と比較検討した。また、新規材料開発支援ツールとしての応用を目指し、新たに合成された生体適合高分子材料の血液適合性を蛋白質吸着挙動から予測・評価した。

(1) 高分子材料の水和状態

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 PMPC は中間水を有する代表的な高分子材料の一つであり、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。

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。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。

PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A は PMEA 類縁体であり、いずれも中間水を有する化合物である。PTHFVE は含水量（42.4%）が比較的高い高分子材料であり、中間水の融解点が -7 付近に存在する。また、PTHFVE は血小板吸着数が低く、優れた抗血栓性を有することが予測されている。MEA とブチルアクリレート（BA）のランダム共重合体（MEA/BA=30/70）である PMe3A の中間水量は 0.008 g/g であり、PMEA（ 0.042 g/g）と比較して低い値を示す。PEOEVE も中間水を有する化合物であるが、血小板粘着等をはじめとした各種特性は検証中である。

(2) 血液適合性評価マーカ候補蛋白質の選定

内因系血液凝固活性化リガンドであるコラーゲン、F1C 及び VTNC は GPVI 受容体等を介して直接的に血小板を活性化する機能を持つため、血液凝固を引き起こす重要な因子の一つとなる。VTNC は、血液適合性に劣る材料上で有意に濃縮されると共に、その同定精度も高いことから、血液適合性評価マーカとして利用できる可能性が高い。Mascot score から判断する限り、F1C の吸着量は材料毎に異なる可能性が示唆されたため、F1C もマーカ候補蛋白質として選定した。各材料には種々のコラーゲンが吸着したが、共通性が乏しく、同定精度も低いいため、マーカ候補蛋白質から除外した。

補体系には古典経路、第 2 経路及びレクチン経路があり、古典経路では抗原に結合した IgG 又は IgM 抗体の Fc 部分（H 鎖）に C1q が結合することが引き金となり、C1r 及び C1s を介して、C2 から C9 に至る一連の補体系が活性化される。第 2 経路では、抗体を介することなく C3 が直接結合し、幾つかの過程を経た後、C5 が活性化されて C6 から C9 補体の活性化が誘導される。レクチン経路では、菌体表層に存在するマンナンとレクチン等のマンナン結合蛋白質が結合することにより MASP が活性化される。MASP は C1s

と類似した作用を持ち、C4 を活性化することにより C3 及び C5 から C9 補体を活性化する。すなわち、補体系においては C1 系、C3、C5 及び MASP が重要な役割を占める。血液適合性に劣る材料上には、C1r、C1s、C3 及び C5 が顕著に吸着した。PMEA 表面上では、これらの補体成分が濃縮される現象は観察されないが、水酸基を有する PHEMA 系材料や PVP 含量が比較的低い PSF 材料等では顕著に濃縮される。また、各補体因子の同定精度も高いことから、これら 4 種類の補体成分をマーカー候補蛋白質として選定した。MASP2 の吸着挙動についても興味ある結果が得られたが、MASP は酢酸セルロース等の糖質系材料との親和性が非常に高く、その他の材料への吸着量と比較することが難しいため、マーカー候補蛋白質から除外した。

補体系の活性化には種々の補助因子が必須である。各補助因子の吸着特性を解析した結果、FHR1 が上記 4 種の補体成分と類似した挙動を示すことから、同因子もマーカー候補蛋白質として選定した。

外因系血液凝固は組織損傷時に放出される組織トロンボプラスチンが引き金となり、FA7 が活性化されることにより一連の血液凝固カスケードが惹起される。また、血液が血管内皮細胞下の組織コラーゲンに接すると血液凝固カスケードの FA12 が活性化され、最終的にフィブリンの重合に至る。すなわち、血液凝固カスケードにおいては、FA7 と FA12 が重要な役割を果たしている。両因子は PVP 含有 PSF 材料上で濃縮される傾向があるが、MEA/HEMA 系材料では顕著な吸着が認められないことから、血液適合性評価マーカーとして利用できる可能性が高い。FIBB も同様な吸着挙動を示すことから、マーカー候補蛋白質として選定した。また、FA9 は PVP 含有 PSF 及び MEA/HEMA 系材料上で顕著に濃縮されたが、Mascot score から判断する限り、その吸着量は材料毎に異なる可能性が示唆されたため、FA9 もマーカー候補蛋白質として選定した。

ホスホリパーゼ群及びセロトニン受容体群は血液凝固に關与する主要な蛋白質の一つであるが、後述するサイトカイン類と同様、Mascot score と Peptide count の値を考慮して、マーカー候補蛋白質から除外した。しかし、PLD5 は PMEA 表面以外の多くの材料上で有意に濃縮されると共に、リン脂質をリン酸エステル部分で切断することにより、血液凝固に關与する陰性荷電リン脂質を遊離させる機能を持つ可能性があるため、マーカー候補蛋白質として選定した。

血液凝固に關与しないと思われる蛋白質群であっても、最も優れた血液適合性を示す PMEA 表面への吸着量が少なく、その他の材料上で顕著に濃縮される蛋白質は血液適合性評価マーカーとして利用できる可能性が非常に高い。各種蛋白質の吸着挙動を解析した結果、GPX3 は MEA/HEMA 系材料への吸着量が少なく、PVP 含有 PSF 材料及び 6 種類の対照材料上で顕著に濃縮されることが判明したため、同蛋白質を有益なマーカー候補蛋白質として選定した。

PVP 含有 PSF 材料、MEA/HEMA 系材料及び過去に測定した各種の対照材料には、多くのリポ蛋白質が吸着した。APOA 系蛋白質は線溶系蛋白質であるプラスミノゲンに類似した構造を持つため、プラスミノゲンに由来する線溶系の活性を低下させることが示唆されている。また、リポ蛋白質の主要構成糖脂質であるスルファチドは血液凝固阻害作用を持つことが報告されているが、リポ蛋白質と血液凝固の相関性には不明な点が多いため、マーカー候補蛋白質から除外した。IL-1 等の炎症性サイトカインは細胞膜表面に組織因子を出現させる機能を持つことが知られている。本研究において解析した各種材料上には、幾つかのインターフェロン及びインターロイキン群が有意に吸着したが、血液適合性との相関性が不明であると共に、いずれの蛋白質ともに Mascot score 及び Peptide count が低く、その同定が不確かなため、サイトカイン類もマーカー候補蛋白質から除外した。抗凝血作用を有

する蛋白質群中、ANT3、PLGB 及び PLMN は幾つかの PSF 材料上で濃縮されたが、これらの蛋白質は血液凝固を抑制する線溶系蛋白質であると共に、その他の多くの材料への顕著な吸着が認められなかった。血小板 顆粒成分である A1AT は、Mascot score 及び Peptide count とともに高く、その同定は確かであるが、各材料上で濃縮されなかった。また、カリクレイン・キニン群として同定された KNG1 も、PSF3-5 を除き、対照材料を含めた多くの材料上で濃縮されなかったことから、これらの蛋白質もマーカ候補から除外した。

(3) 血液適合性評価マーカの検証

2-1. 標的プロテオミクス

23 種類の材料に吸着する血漿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（ペプチド）を SRM 解析により絶対定量した。各ペプチドの分離状況は良好であり、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低濃度領域から高濃度領域まで良好な相関が得られた。また、各トランジットイオンの定量・定性用チャンネルのイオン検出状況も良好であった。

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示唆された。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。また、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は偽陰性を示す材料が存在したが、最も良好な血液適合性を有すると思われる PMEAA を基準とした場合は、C1r、C3、FHR1 も評価マーカとして利用できる可能性が示唆された。

2-2. 過去の報告との相関性評価

近年、狭心症、心筋梗塞及び重症下肢虚血等の虚血性疾患に対してステント治療が盛んに行われている。従来の金属ステントのプラットフォームは SUS、Co-Cr、Ni-Ti 等の金属から構成されている。一方、ステント治療の有害事象として観察される再狭窄とステント血栓症の問題は未解決であり、新規材料や新たな *in vivo* 評価法の開発が進められている。

DLC は低摩擦や低摩耗、高硬度、化学的安定性等様々な特性を有するため、1990 年代よりバイオマテリアル分野への応用研究が始まった。ステントへの応用は 2000 年頃から報告されており、DLC コーティングによる抗血栓性効果や新生内膜増殖の抑制効果が血液回路を用いた *in vitro* 実験や動物実験等により明らかとされた。これらの結果に基づき DLC 系コーティングステントが発売されたが、臨床使用においては従来の金属ステントと比較して著明な再狭窄抑制効果が認められなかった。一方、DLC にフッ素を組み込むことにより、疎水性、柔軟性及び抗血栓性を付与したフッ素添加 DLC (F-DLC) は、SUS や DLC と比較して、ヒト血液を利用した実験において血小板付着抑制能を示すと共に、ラット皮下における炎症反応を過度に惹起しないことが確認されている。F-DLC は DLC と比較して血小板の活性化を抑制する効果や蛋白質吸着を減少させる効果を有することも *in vitro* 実験において確認された。近年、ミニプタを用いた動物実験において、F-DLC ステント留置後の新生内膜の増殖から軽度退縮に至る経時的変化が血管内超音波法により評価された結果、従来の金属ステントと比較して、F-DLC ステントの狭窄率ピークは有意に低下することが明らかにされている。

本研究において使用した SUS/30%F/DLC に吸着する総蛋白質量は、その他の材料と比較して若干高い傾向が認められたが、血液凝固関連蛋

白質の吸着は SUS や Co-Cr と比較して顕著に抑制されており、ヒト血液を用いた *in vitro* 血小板吸着試験やミニブタを使用した *in vivo* 再狭窄評価試験と一致する成績が得られた。本研究において確認された SUS/DLC 及び中間層にケイ素を導入した SUS/Si-DLC の血液適合性は SUS 以上、Co-Cr 以下であり、この成績は DLC ステントが臨床使用において顕著な再狭窄抑制効果を示さなかった報告と一致していた。

血管ステント留置後の再狭窄は、ステント自体の血液適合性、血管内壁に対する物理的刺激による損傷又は炎症誘導のほか、溶出する金属イオン等によるアレルギー性炎症反応の惹起に起因する。Ni-Ti は、総蛋白質吸着量が最も低く、血液凝固関連蛋白質の吸着挙動から、SUS/30%F/DLC に匹敵する優れた血液適合性を有することが予測された。しかし、従来の金属ステントと比較して、SUS/30%F/DLC の再狭窄率は有意に低いことが過去に報告された *in vivo* 試験により示唆されていることから、血管ステントの生物学的安全性は血液適合性のほか、材質や形状の相違による周辺組織への影響も含めて、総合的に評価する必要があることが再確認された。

(4) 新規高分子材料の血液適合性への応用

現在までに選定した血液適合性評価マーカ候補に着目して、新規高分子材料である PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A の特性を検討した結果、PMe3A は対照として用いた UHMWPE よりも血液適合性に劣る成績が得られた。これは PMe3A の中間水量が PMEA と比較して少ないと共に、中間水を持たない BA ユニットが密集する構造が分子中に存在する可能性があることに由来すると考えられる。後者の問題は、ランダム共重合体ではなく、ユニット共重合体を合成することにより解消できるため、今後、分子設計を最適化する必要があると思われる。一方、血液適合性評価マーカ候補蛋白質の吸着挙動が PMEA とほぼ同等

である PTHFVE は PMEA に匹敵する優れた血液適合性を有することが示唆された。PEOEVE への血液凝固関連蛋白質の吸着は抑制される傾向が認められたが、C1 系及び C9 を除く補体の吸着量が UHMWPE と同等であると共に、FINC 及び VTNC の吸着能も十分抑制されていないことから、PEOEVE の血液適合性は PMEA 及び PTHFVE と比較して劣ることが示唆された。水酸基を有する PHEMA は UHMWPE とほぼ同等の補体吸着特性を示し、PMEA や PTHFVE と異なり、補体を吸着し易い性質を有することが再確認された。

E . 結 論

医用材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿蛋白質の種類及び量から予測・評価できることが示唆された。今後、標的プロテオミクス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 (n=10) を行い、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を更に検証する。また、本評価法を公定法として広めるため、ELISA 等の簡易な測定系を利用した試験法の開発を目指す。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表等

<誌上発表>

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 中村里香, 酒井信夫, 藪島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 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).
- 5) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 102B:1809-1816 (2014).
- 6) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, 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*, 102B: 721-728 (2014).
- 7) 藪島由二. 第1部: 医療機器市場の拡大と新規製品の開発: 開発, 上市化, 市場確保において留意すべきポイント. 生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略(監修: 田中 賢). *サイエンス&テクノロジー*, pp.3-21 (2014).
- 8) 新見伸吾, 梅津光夫, 伊関 洋, 岩崎清隆, 笠貫 宏, 原田 昇, 光石 衛, 北森武彦, 鄭 雄一, 中岡竜介, 藪島由二. 早稲田大学先端生命科学センター (TWIns) 及び東京大学大学院工学系研究科との連携による革新的医薬品・医療機器・再生医療製品等実用化促進事業. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 132:16-18 (2014).
- 9) 中岡竜介, 藪島由二, 新見伸吾. 医療機器・材料の国際標準化動向. *バイオマテリアル生体材料*, 33(1):56-63 (2015).
- 10) Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A, Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung U, Ogawa K, Niimi S, Yoshida M. Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers. *J. Vinyl Add. Technol.*, in press (2015).

<学会発表>

- 1) 藪島由二. 第7部: 発熱性物質試験. 説明会: 医療機器の生物学的安全性評価に関連する規格等の最近の改正について(2012年5月・東京).
- 2) 藪島由二. 第7部: 発熱性物質試験: 各試験法の特徴と操作方法等について. 医療機器の生物学的安全性試験法講習会(2012年9月・東京).
- 3) 藪島由二, 福井千恵, 柚場俊康, 松岡厚子. 溶血性試験用陽性対照材料の開発と性能評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012(2012年11月・仙台).
- 4) 藪島由二, 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年11月・仙台).
- 5) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料の表面

- 近傍における水和状態のシミュレーション的評価 .日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 6) 迫田秀行, 藪島由二, 松岡厚子 . スクアレンによる超高分子量ポリエチレンの劣化機構に関する検討 .日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 7) 河野 健, 澤田留美, 伊佐間和郎, 藪島由二, 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年11月・仙台).
- 8) 藪島由二, 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 . 日本薬学会第 133 年会(2013年3月・横浜).
- 9) 藪島由二, 澤田留美, 福井千恵, 松岡厚子 . 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 蛋白質発現の網羅的解析による検討 . 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013年3月・横浜).
- 10) 澤田留美, 藪島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子 . 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 遺伝子発現の網羅的解析による検討 . 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013年3月・横浜).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 中岡竜介, 比留間 瞳, 藪島由二, 新見伸吾 . SAM を利用したペ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).
- 19) 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).
- 20) 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: ラット精巢に及ぼす DOTP の影響評価. 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月・熊本).
- 21) 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).
- 22) 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 (Dec., 2013 in Singapore).
- 23) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 医用材料の生体適合性評価指標開発を目的とした表面の水和上体に関する分子動力学シミュレーション. 第 54 回日本生体医工学会大会 (2014 年 5 月・名古屋).
- 24) 中岡竜介, 藪島由二, 新見伸吾. 橋渡し研究及び国際標準化の行政的支援. 第 53 回日本生体医工学会大会 (2014 年 6 月・仙台).
- 25) 藪島由二, 福井千恵, 比留間 瞳, 野村祐介, 田中 賢, 新見伸吾. 蛋白質吸着挙動に基づく血液適合性評価マーカの検証に関する研究. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 26) 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, 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 年 11 月・船堀).
- 27) 藪島由二, 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¹, 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 年 11 月・船堀).
- 28) 野村祐介, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 杉山知子, 竹ノ内美香, 新見伸吾, 藪島由二. 簡易溶血性試験法の性能評価と公定法との比較検証. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 29) 野村祐介, 福井千恵, 戸井田 瞳, 新見伸吾, 宮川 伸, 金 玲, 中村義一, 藪島由二. RNA アプタマーを用いた新規医用材料の開発. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 30) 加藤玲子, 藪島由二, 福井千恵, 比留間 瞳, 宮島敦子, 新見伸吾. ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 31) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 分子動力学的シミュレーションによる PMEA 分子に存在する水の挙動解析. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 32) 迫田秀行, 柚場俊康, 向井智和, 新見伸吾, 藪島由二. 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの力学特性. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 33) 藪島由二. 医療機器・再生医療等製品分野におけるエンドトキシンの諸問題. 第 30 回 GMP

とバリデーションをめぐる諸問題に関する
シンポジウム(2015年3月・品川).

- 34)Olsen DS, Lee M, Turley A, Sasaki S,
Yamasaki K, Fukui C, Nomura Y, Kato R, Yuba
T, Sakaguchi K, Haishima Y. Extractable
positive control for in vitro skin
irritation testing of medical devices.
54th Annual Meeting and ToxExpo (March
22-25, 2015, San Diego).

<知的財産権の出願・登録状況>

- 1)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。
- 2)藪島由二,福井千恵,河上強志,迫田秀行,
野村祐介,伊佐間和郎,新見伸吾,柚場俊康,
向井智和,清麻里子。「医療用バッグ」。出願
番号：特願 2015-17514,出願日：2015 年 1
月 30 日。