

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

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 新見伸吾

平成 26 (2014) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

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 新見 伸吾	1
-------------------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 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 齧島 由二	15
2. 医用材料の血液適合性を含む生体適合性における細胞応答に関する研究 宮島 敦子	28
3. 細胞内タンパク質発現解析を利用した医用材料の血液適合性評価に関する研究 加藤 玲子	44
4. 遺伝子発現の網羅的解析を利用した医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験 澤田 留美	58
5. 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 植松 美幸	96
6. タンパク質吸着の動力学的解析 河上 強志	104
7. 材料表面近傍の水和状態とタンパク質吸着挙動解析 石原 一彦	116
8. 国際標準歯科インプラント材料の有効性及び安全性評価に関する研究 佐々木 啓一	122

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌）

129

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

総括研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器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」

研究代表者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部長

研究分担者 藪島由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第一室長
宮島敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第二室長
加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官
澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室長
植松美幸 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官
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
石原一彦 東京大学大学院 工学系研究科 教授
佐々木啓一 東北大学大学院 歯学研究科 科長

研究要旨

近年、材料/細胞界面特性を支配する主要因子である水和状態、イオン及び蛋白質吸着挙動等は、医用材料が持つ血液適合性や骨親和性のほか、力学的特性にも関与することが明らかになりつつある。本研究では、これら支配因子の他、材料上で培養した細胞の挙動を分子レベルで詳細に検討後、医用材料が示す生物学的特性等との相関の総合的な検証により、各因子を指標とした医用材料の生体適合性を *in vitro* 材料で評価する簡易スクリーニング系を開発することを目的として検討を行っている。

今年度は、高分子材料の血液適合性を評価・予測する簡易 *in vitro* 試験法の開発を目指して、種々の基礎データを収集した結果、同材料の血液適合性は表面に吸着する血漿蛋白質の種類と量、結合・解離速度定数のほか、材料上で培養した細胞の遺伝子及び蛋白質発現挙動を指標として評価できる可能性を見出した。既存試験法の予備的検証実験においては、現在、改訂作業が進められている ISO/WD 10993-4 (血液適合性試験) に掲げられている試験項目の妥当性評価を兼ねて検討した結果、高分子材料の血液適合性は TAT 活性を指標として評価できる可能性が示唆された。また、血液適合性と密接に関与する中間水の存在の有無は、実際に材料を化学合成することなく、その構造から分子動力的シミュレーションを用いた *in silico* 解析により予測できる可能性が示唆されたと共に、新規生体適合性高分子材料の創製にあたっては、官能基との相互作用を引き起こす分子間相互作用を排除する表面設計が必要不可欠であることが判明した。歯科

用インプラントに関する研究では、歯科用インプラントの機械的強度の承認審査で行うべきワーストケース設定やインプラント表面処理方法等に関する考え方を科学的根拠に基づいて学術的に検討・整理し、歯科インプラントが真に具備すべき要件を再考し、「課題解決に向けた提言」を取りまとめた。

A. 研究目的

身体と接触する医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物及び残留物等に由来する各種毒性、微生物汚染に由来する感染性因子の他、材料表面の物理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イス）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（図1）。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。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。近年、材料/細胞界面特性を支配する主要因子である水和状態、イオン及び蛋白質挙動等は、材料が持つ血液適合性や骨親和性の他、力学的特性にも関与することが明らかになりつつある。そこで本研究では、これらの諸因子と材料の生物学的特性との相関性を解明し、新規医療機器の安全性と有効性を評価するための新たな簡易評価法として応用すると共に、製品開発における材料選択を支援することを目指して検討を行なっている。

一方、臨床現場において生体適合性が問題となる医療機器の使用頻度は循環器系医療機器がその他の医療機器と比較し

て圧倒的に多いのが現状であり、長期間にわたって血液凝固や血栓等を起こさないことが要求される。また、歯科インプラント分野においては新規製品の開発が顕著化しているが、検査方法や国内外の審査基準の相違等に由来するデバイス・ラグを解消することが大きな課題となっている。

今年度は、主に血液適合性に着目して、生体適合性に優れた PMEA/PHEMA コポリマー等の高分子材料を、材料/細胞界面特性を支配する水和状態、材料への蛋白質吸着及び官能基の影響、並びに材料上で培養した細胞の遺伝子及び蛋白質の発現状態等について検討した。さらに、歯科用インプラントについて、科学的な根拠に基づく学術的な研究による承認審査基準の策定を目指した検討を行った。

本研究の成果は医療機器の開発及び厚生行政に大きく貢献することが期待される。

B. 研究方法

研究方法の概略を以下に記載する。詳細については各分担研究報告書を参照のこと。

(1) 新規材料の物理化学的特性評価

ATRP 法によりシリコン基板上に MPC、TMAEMA、SPMA 及び BMA のポリマーブラシを形成し、蛋白質（BSA、Lys）及び官能基（COOH、NH₂ 及び CH³ 基 SAM）との相

相互作用を AFM フォースカーブ測定により解析した（石原）。

(2) 材料 / 細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、これまでに選定したマーカ候補蛋白質の有用性を検証するために、定量用標準ペプチドを化学合成し、血液適合性の異なる 23 種類の材料に吸着するヒト血漿蛋白質を試料として、LC-MS/MS (TSQ Vantage / Advance NanoUPLC) を用いて各候補蛋白質の絶対定量を行った（藪島）。蛋白質吸着の動力学的解析に関する研究では、水晶板上にスピンコータを利用して PMEA、PHEMA 及び MEA/ HEMA ランダム共重合体をコーティングした QCM センサーと種々の濃度の ALB、FIB 及び FINC との相互作用を緩和法により測定し、その QCM センサーグラムから、データ解析ソフトウェア（AQUA Ver. 2.0）を利用して結合速度定数、解離速度定数、結合定数及び解離定数を算出した（河上）。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、主な解析ソフトウェアとして Materials Studio を利用し、エネルギーを最小化した PMEA 50 量体分子に 100 個の水分子を配置させたセル構造を作成した後、300K から 500K の Annealing 処理及び Dynamics 解析を行い、メトキシ基周辺に存在する水分子の個数と同基からの距離に応じた水分子の動きを計算した（植松）。また、既存試験法の予備的検証実験では、PP チューブ中で PC、PET、PMEA、PHEMA、PMPC 及び MEA/ HEMA

ランダム共重合体材料を浸漬した用時調製ヘパリン加ヒト血液の補体 (C3a、C5a、SC5b-9)、血小板 (-TG) 及び血液凝固系 (TAT) 活性を市販 ELISA により測定すると共に、溶血性を簡易法により評価した（宮島）。

(3) 細胞挙動解析

TCPS、PC、PMEA、PHEMA 及び組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体等の材料上で hMSC 又は THP-1 細胞を常法に従って 1 日又は 2 日間培養し、細胞内の遺伝子及び蛋白質発現挙動を解析した（澤田、加藤）。遺伝子発現プロファイルの解析においては、培養細胞から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を調製し、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を利用して mRNA 発現を網羅的に測定した後、GeneSpring GX 12.5 ソフトウェアによる統計学的・生物学的解析及び IPA を用いたパスウェイ解析を実施した（澤田）。蛋白質発現挙動の解析においては、PBS で洗浄した細胞を細胞溶解液に溶解し、2D clean-Up Kit による精製、蛋白質定量、還元、アルキル化及び脱塩した試料を NanoLC-MS/MS ショットガン解析に供した後、PD v1.3/Mascot/Swiss-Prot データベース解析により蛋白質を同定し、SIEVE 2.0 ソフトウェアを用いて多変量解析を行った（加藤）。

(4) 歯科用インプラントに関する研究

日本補綴歯科学会、日本口腔インプラント学会及び日本歯科理工学会等と連携し、歯科インプラントの機械的強度に係るワーストケース設定の根拠やインプラント表面処理方法等の考え方につ

いて国際的な動向を踏まえて討議した。平成 25 年度は班会議を 3 回開催し、厚生労働省医療機器審査管理室及び PMDA 関係者を交えて、審査の現状や問題点等についても協議した（佐々木）。

2. 倫理面の配慮

本研究に用いた骨髄由来間葉系幹細胞及びヒト単球は、市販品であり、倫理的に問題はないと考えられる。ヒト血液を用いる実験では国立医薬品食品衛生研究所研究倫理委員会規定に従って実施している。

C. 研究結果

研究結果の概略を以下に記載する。詳細は各分担研究報告書に記載の通りである。

(1) 新規材料の物理化学的特性評価

材料表面近傍の水和状態と蛋白質吸着挙動解析に関する研究では、AFM のフォースカーブ測定により、材料表面と蛋白質の相互作用を定量的に分析する手法を確立した。ポリマーブラシ表面への蛋白質吸着挙動は官能基レベルの静電的及び疎水性相互作用に比例することが示された（石原）。

(2) 材料 / 細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、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（藪島）。蛋白質吸着の動力学的解析に関する研究では、FIB 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を示すことが確認された（河上）。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、メトキシ基近傍に存在する水分子がバルク水と交換される現象が観測されたことから、当該水分子がシミュレーションで判別できる中間水に相当する可能性が示唆された（植松）。また、既存試験法の予備的検証実験において、血液適合性の異なる高分子材料を浸漬したヒト血液において TAT 活性は材料が有する血液適合性と相関する可能性が示唆された（宮島）。

(3) 細胞挙動解析

hMSC の遺伝子発現プロファイルにおいて、細胞の運動性や未分化性の維持等に関与する EMT Pathway の亢進が全群に認められ、MEA の割合が高い方がより亢進され易い可能性があることが示唆された。また、THP-1 を用いて遺伝子群の発現変化によって疾病関連機能や生体機能に及ぼされる影響について評価した結果、PMEA では有意に上昇する機能が多く観察され、PHEMA では逆に低下する機能が多く認められた（澤田）。また、THP-1 の細胞内蛋白質発現挙動において、血液適合性の高い PMEA では炎症系蛋白質、血液凝固関連蛋白質及び細胞形態・接着に関与する一連の蛋白質の誘導が低下する傾向が認められた（加藤）。

(4) 歯科用インプラントに関する研究

アカデミア及び PMDA との連携のもと、歯科用インプラントの機械的強度の承認審査で行うべきワーストケース設定やインプラント表面処理方法等に関する考え方

を科学的根拠に基づいて学術的に検討・整理し、歯科インプラントが真に具備すべき要件を再考し、「課題解決に向けた提言」を取りまとめた（佐々木）。

D. 考察

(1)新規材料の物理化学的特性評価

材料表面近傍の水和状態と蛋白質吸着挙動解析に関する研究では、材料表面への蛋白質吸着を高度に抑制するには、官能基との相互作用を引き起こす分子間相互作用を排除することが不可欠であることが判明した（石原）。

(2)材料/細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、今回利用出来ることが明らかとなった血液適合性マーカ蛋白質については、繰り返し測定を行い、血液適合性の適否を判定する閾値を平均値と RSD から提案する予定である（藪島）。蛋白質吸着の動力学的解析に関する研究では、その他の血液適合性が異なる高分子材料及び血液適合性評価マーカ蛋白質を用いて同様な解析を行う予定である（河上）。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、中間水とバルク水の差異をより適切に示すため、今後、官能基に捕捉された時間を用いた解析についても検討する（植松）。血液適合性試験については、今後引き続き、試験系に適切性、検出感度等に関する基礎データを収集し検証する（宮島）。

(3)細胞挙動解析

EMT の誘導により細胞の運動性の亢進や細胞外基質の蓄積、細胞老化の抑制、幹細胞様機能（未分化性など）の獲得などが示されており、PMEA/PHEMA コポリマーコーティング材料が hMSC におけるこれらの機能へ影響を与える可能性が示唆された。一方、THP-1 細胞においては疾病関連機能や生体機能に関連する遺伝子群に対し、PMEA と PHEMA は相反する作用を示すことが示唆された（澤田）。PHEMA 及び PEMA ポリマー材料が、THP-1 細胞の細胞内蛋白質挙動に及ぼす結果から、これらポリマー材料が血液凝固、炎症を促進する可能性は低いことが示唆された（加藤）。今後は内皮細胞等その他の血液関連細胞を用いて同様の検討を行う予定である（澤田、加藤）。

(4) 歯科用インプラントに関する研究

疲労試験におけるワーストケースについては、審査側と申請者の考え方が一致していない点が多く見受けられ、種々の観点から「課題解決に向けた提言」の取り纏めを行った意義は大きい。今後は有限解析データの適切な活用方法、既承認品との比較方法等について検討することとする（佐々木）。

E. 結論

(1)新規材料の物理化学的特性評価

材料表面近傍の水和状態と蛋白質吸着挙動解析に関する研究では、AFM のフォースカーブ測定により、材料表面と蛋白質の相互作用を定量的に分析する手法を確

立した。(石原)。

(2)材料/細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、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(藪島)。蛋白質吸着の動力学的解析に関する研究では、FIB 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を示すことが確認された(河上)。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、メトキシ基近傍に存在し、バルク水と交換される水分子がシミュレーションで判別できる中間水に相当する可能性が示唆された(植松)。また、既存試験法の予備的検証実験において、TAT 活性は材料が有する血液適合性と相関する可能性が示唆された(宮島)。

(3)細胞挙動解析

遺伝子発現解析では、hMSC の運動性や未分化性の維持等に関与する EMT Pathway の亢進が認められ、MEA の割合が高い方がより亢進され易い可能性があることが示唆された。また THP-1 では、PMEA によって有意に上昇する疾病関連機能や生体機能が多く観察され、PHEMA では逆に低下する機能が多く認められた(澤田)。THP-1 の細胞内蛋白質発現解析では、血液適合性の高い PMEA では炎症系蛋白質、血液凝固関連蛋白質及び細胞形態・接着に関与する一連の蛋白質の誘導が低下す

る傾向が認められた(加藤)。

本研究で得られた成果は、将来、JIS 及び ISO 規格として標準化することを視野に入れている。また、歯科分野に係る研究成果として、新たな歯科インプラント材料の審査基準が策定されるため、同材料のデバイス・ラグを解消できることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(論文及び総説)

- 1) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura 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, 102:721-728 (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) 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)
- 5) 中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 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)
- 6) Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Miyajima A and Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos. *J. Toxicol. Sci.* 39:285-292 (2014)
- 7) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y and Matsuoka A. The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomed. Mater. Res. Part A*, 101:2573-2585 (2013)
- 8) Kono K, Niimi S and Sawada R. Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone Marrow Res.*, in press
- 9) Ito-Nagahata T, Kurihara C, Hasebe M, Ishii A, Yamashita K, Iwabuchi M, Sonoda M, Fukuhara K, Sawada R, Matsuoka A and Fujiwara Y. Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:1229-1235 (2013)
- 10) Sato Y, Tsutsumi H, Sawada R, Suzuki T and Yasuda S. Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products. *Bull. Natl. Inst. Health. Sci.* 131:16-19 (2013)
- 11) Harashima M, Seki T, Ariga T and Niimi S. Role of p16(INK4a) in the inhibition of DNA synthesis by HGF or EGF in primary cultured rat hepatocytes. *Biomed. Res.* 34:269-273 (2013)
- 12) Arakaki N, Yamashita A, Niimi S and Yamazaki T. Involvement of reactive oxygen species in osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells accompanied by mitochondrial morphological dynamics. *Biomed. Res.* 34:161-166 (2013)

- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) Sakata S, Inoue Y and Ishihara K. Quantitative evaluation of interaction force between functional groups in protein and polymer brush surfaces. *Langmuir*. 30:2745-2751 (2014)
- 16) Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R and Ogasawara K. NKG2D(+) IFN- (+) CD8(+) T cells are responsible for palladium allergy. *PLoS One*. 9:e86810, (2014)
- 17) Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K and Niwano Y. In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. *PLoS One*. 8:e81316, (2013)
2. 学会発表
- 1) 齋島由二, 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)
- 2) 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 (2013.12, Singapore).
- 3) 齋島由二, 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)
- 4) 齋島由二, 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ーの選定について. 第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013年11月・船堀)

- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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学的解析 (第 2 報). 第 42 回医用高分子シンポジウム(2013 年 7 月・青海)
- 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 (2013.6, Boston)
- 12) 澤田留美. 再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立を目指して. 日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013 年 5 月)
- 13) 松岡厚子, 澤田留美, 加藤玲子, 河野健. 次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野審査 WG 活動報告. 日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー(2013 年 5 月)
- 14) Kono K, Sawada R, and Matsuoka A. Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013.6, Boston)
- 15) Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Kuroda T, Sawada R, Tsutsumi H, Kawamata S, and Sato Y. Validation of in vivo tumorigenicity test for the process control of

- cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013.6, Boston)
- 16) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾. 間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月)
- 17) Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A, Tsutsumi H, Kawamata S, and Sato Y. Characterization of in vivo tumorigenicity test using severe immunodeficient NOG mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2013 (2013.12, San Antonio)
- 18) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾. 間葉系幹細胞の増殖培養過程における品質評価のための遺伝子発現解析 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)
- 19) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美. 間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究. 第 13 回日本再生医療学会総会 (201 年 3 月)
- 20) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 竹内一郎, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司. 細胞画像情報解析による間葉系幹細胞分化能の品質プロファイリング. 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月)
- 21) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, and Matsuoka A. Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (2013.9, Interlaken)
- 22) 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾. 生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀)
- 23) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾. 多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響. 第 27 回日本軟骨代謝学会 (2014 年 2 月・京都)
- 24) 澤田留美, 河野健, 加藤玲子, 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 (1): 遺伝子発現の網羅的解析. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月・船堀)
- 25) Isama K, Kawakami T, and Matsuoka A. Surface characteristics and apatite-forming ability of calcium-incorporating titanium. 25th European Conference on Biomaterials (2013.9, Madrid)
- 26) 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年11月・船堀)
- 27) 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)
- 28) Sakata S, Inoue Y, and Ishihara K. Interaction forces related to protein adsorption on polymer brush surfaces. The Society For Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition: Biomaterials Revolution (2013.4, Boston)
- 29) 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 (2013 年 5 月・京都)
- 30) 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 (2013 年 9 月・金沢)
- 31) Sakata S, Inoue Y, and Ishihara K. Nano-force Analysis for Understanding Protein-Materials Interactions. 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013 (2013.10, Tokyo)
- 32) 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 (2013 年 11 月・東京)
- 33) 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 (2013 年 12 月・横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究協力者

- 田中賢 山形大学大学院理工学研究科 教授
- 中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 埋植医療機器評価室長
- 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
- 河野健 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 研究員
- 中野達也 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 第四室長
- 瀬川勝智 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官
- 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
- 小森谷薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
- 新家光雄 東北大学金属材料研究所 研究所長・教授、日本金属学会 理事
- 埴隆夫 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 研究所長・教授、
日本歯科理工学会 理事長
- 渡邊文彦 日本歯科大学新潟生命歯学部 教授、日本口腔インプラント学会 理事長
- 古谷野潔 九州大学歯学研究院 教授、日本口腔インプラント学会 理事・学術委員長、
日本補綴歯科学会 理事・前理事長
- 矢谷博文 大阪大学大学院歯学研究科 教授、日本補綴歯科学会 理事長
- 窪木拓男 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 歯学部長・教授、
日本補綴歯科学会 理事・学術委員長
- 東藤貢 九州大学応用力学研究所 准教授
- 金高弘恭 東北大学大学院歯学研究科 准教授、PMDA医療機器審査第二部

【本文中で使用された略号】

ATRP: Atom Transfer Radical Polymerization
MPC: 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
TMAEMA: Tri(methyl)ammonium ethylmethacrylate
SPMA: 3-sulfopropylmethacrylate
BMA: *n*-butyl methacrylate
BSA: bovine serum albumin
Lys: Lysozyme (ニワトリ卵白由来)
AFM: Atomic Force Microscopy
PMEA : Poly(2-methoxyethyl acrylate)
PHEMA : Poly(hydroxyl-ethyl methacrylate)
ALB: Albumin
FIB: Fibrinogen
FINC: Fibronectin
QCM: Quartz Crystal Microbalance
PP: Polypropylene
PC: Polycarbonate
PET: Polyethylene terephthalate
PMPC: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)
-TG: -Thromboglobulin
TAT: Thrombin-Antithrombin Complex
TCPS: Tissue culture-treated polystyrene
hMSC: Human Mesenchymal Stem Cells
FA7: Factor
FA9: Factor
C1s : Complement C1s subcomponent
EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition

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

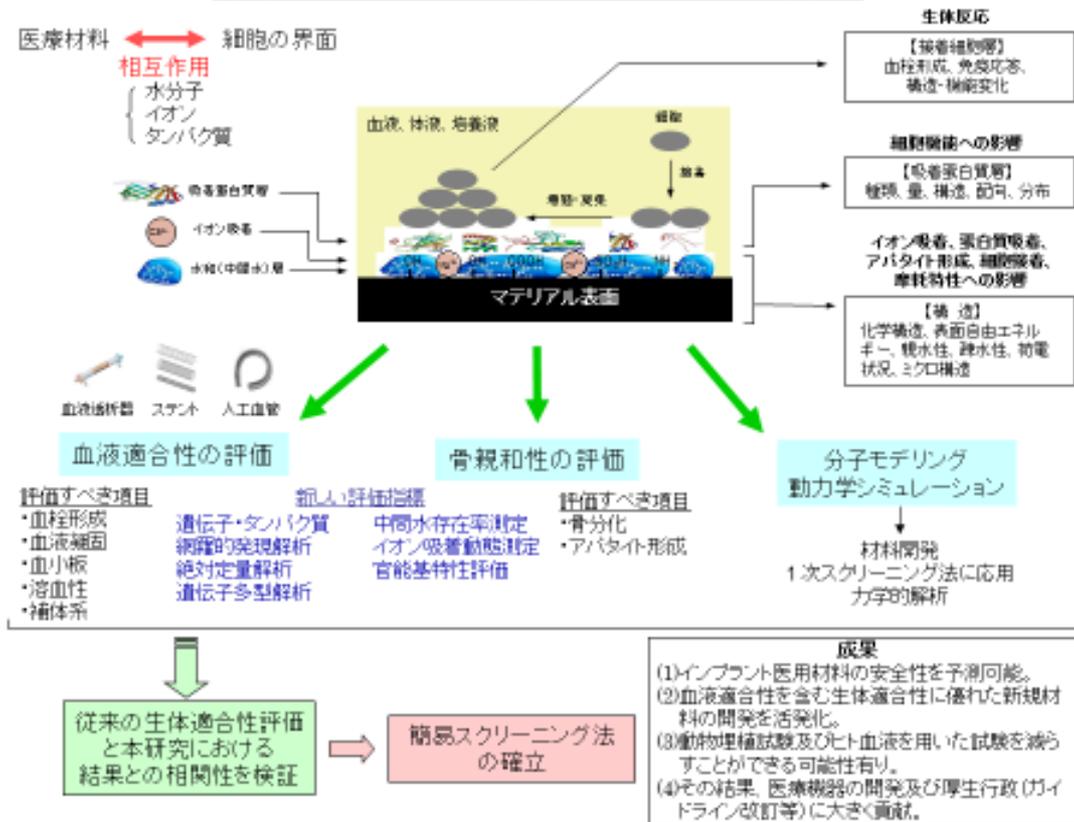


図1 革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究

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ー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ー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ー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ー候補蛋白質の絶対定量を行い、血液適合性評価マーカー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 NH_4HCO_3 (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）．
- 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	FGNSALTIQ 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 LD R	11Leu:13C6, 15N	None	2	1477.77715	1483.78649
FA9	Coagulation factor IX	365-373	SALVLQ V LR	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	EIMENYN I ALR	10Leu:13C6, 15N	None	2	1365.68242	1371.69176
GPX3	Glutathione peroxidase 3	186-197	FLV G PDG I PI M R	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

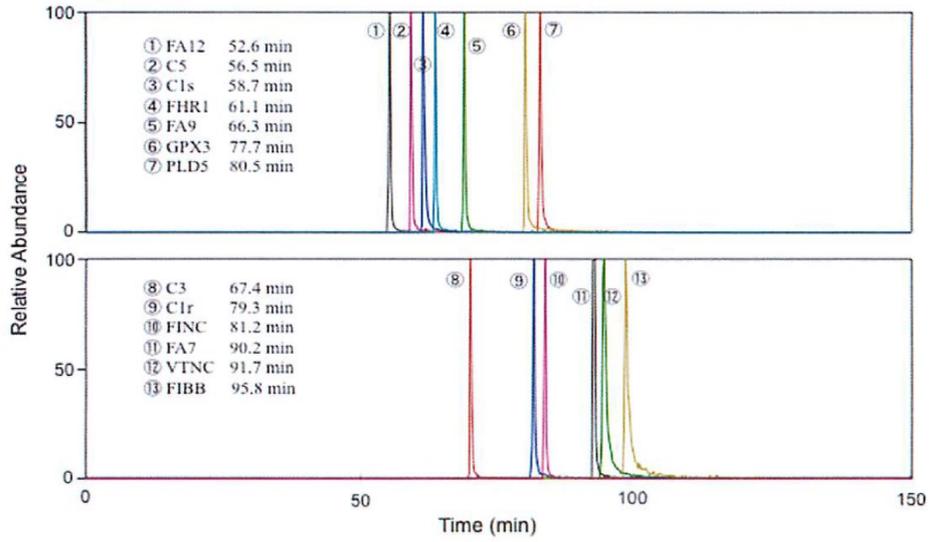


図1. LC-MS/MS分析における標準品の保持時間とピーク分離状況

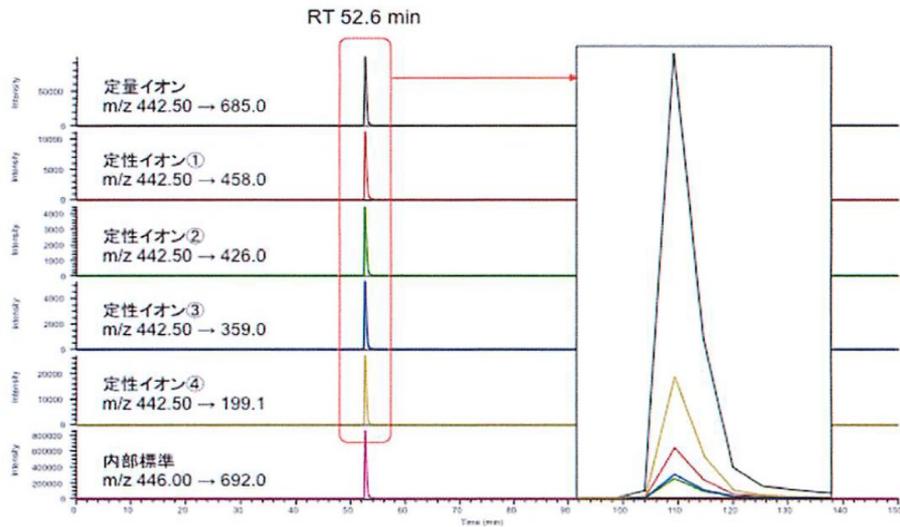


図2. FA12定性・定量用チャンネルのイオン検出状況(標準品)

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

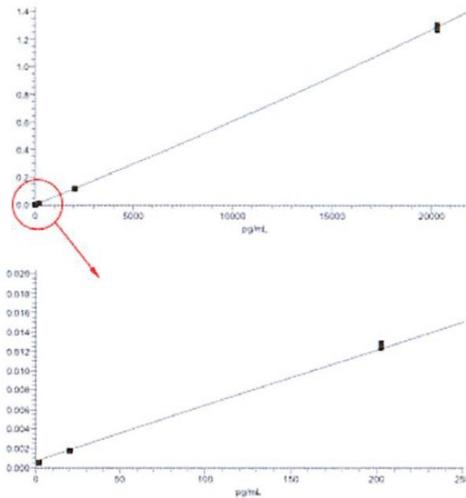


図3. 検量線の相関係数とFA12用検量線

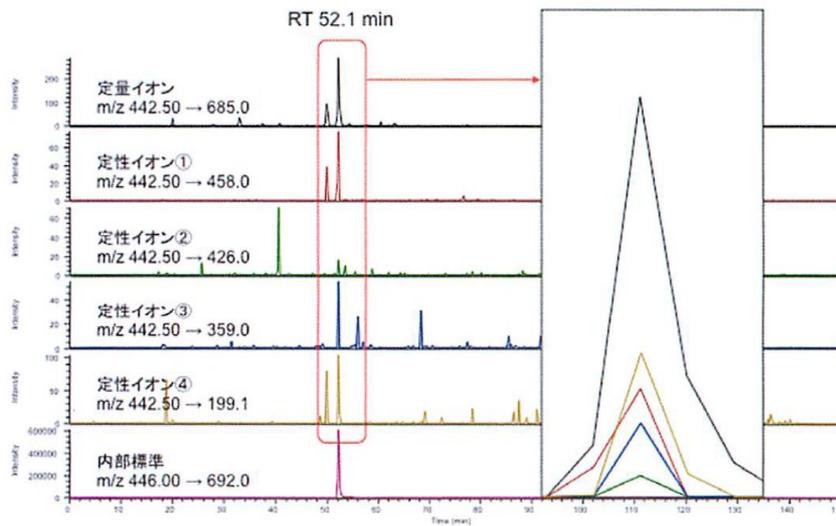


図4. FA12定性・定量用チャンネルのイオン検出状況(実試料:Ti-2)

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
医用材料の血液適合性を含む生体適合性における細胞応答に関する研究

研究分担者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
研究協力者 小森谷 薫 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
田中 賢 山形大学大学院理工学研究科

研究要旨

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については、血液適合性試験が要求される。現在、本邦においては、平成 24 年 3 月に発出された通知をもとに試験が実施されている。この通知において、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の 5 つの試験項目が挙げられている。評価項目の中から製品の用途、血液との接触期間等に応じて選択、実施されるが、試験の実施方法についての詳細な記載があるのは溶血性試験についてのみであり、ヒトの血液を用いて実施する試験法については、試験系の適切性、検出感度などについての検証が十分に行われていない。

本年度の研究においては、各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、まず試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、次に高分子材料に対して、実際に血液適合性試験を実施した。混合比の異なる 2-methoxyethyl acrylate (MEA) / 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) シート及び 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) シートを用いて、予備試験及び本試験を行った結果、TAT 及び β -TG では、大まかな傾向が似ていた。C3a、C5a、SC5b-9 では、両試験で結果がほぼ一致していた。C3a では、2 時間のインキュベーションによりシートなしでも値が上昇し、被験試料による差はほとんど観察されなかった。C5a、SC5b-9 では、特定のシートにおいて上昇が観察された。MEA/HEMA の混合比を変えたシート間では、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9 で HEMA の比率が増えるに従って値が増加する傾向が観察された。今後、引き続き MEA、HEMA、MPC 等の高分子材料に対して、血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について検証を進め、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

一方、混合比の異なる MEA/HEMA シートについて、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、抽出法により V79 細胞に対する細胞毒性試験を実施した。その結果、いずれの混合比の MEA/HEMA シートにおいても細胞毒性は認められなかった。

A . 研究目的

医用材料の生体適合性は、材料表面の物理学的特性により大きく影響される。循環器系医療機器の基本的かつ最も重要な特性として、血液との接触があげられる。特に埋植する機器では、長期間にわたって血液凝固、血栓形成を起こさないことが要求される。医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については、血液適合性試験が要求される。本邦においては、図1に示すように、平成15年2月に発出された「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」（厚生労働省 薬食機発 0213001号 通知）、平成15年3月に発出された「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」（医療機器審査 No.36 事務連絡）に基づいて、長年、生物学的安全性試験が実施されてきた。この事務連絡中で、血液適合性試験においてはISO 10993-4(1992)、ISO/DIS 10993-4(2000)、ASTM F756-93が引用規格にされており、評価概要、溶血性試験、試料の調製法について言及されていた。これらの通知及び事務連絡に対して見直しが進められ、平成24年3月に「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（薬食機発 0301 第20号 通知）が発出され、現在はこの通知を元に、生物学的安全性試験が行われている。血液適合性試験に関しては、2002年に発行されたISO 10993-4 (Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4, Selection of Test for Interactions with Blood) 本体及び2006年に発行された Amendment が、国際的な規格となっているが、2009年より改訂作業が進められている。本邦において平成24年発出された第20号通知では、このISO 10993-4(2002) /Amd.1(2006)及びASTM

F756-08が、引用規格となっている。これらの通知、規格において、試験について詳細な方法が規定されているのは、赤血球に対する影響を評価する試験法である溶血性試験についてだけであり、その他の評価項目については、詳細は規定されていない。溶血性試験についても、米国で規格化されたNIH法、ASTM法及び日本のMHLW法の3種の試験法が存在し、試験法により判定に差が生じる例もあり、国際的にみても整備されていない状況にある。溶血性試験については、ISO 10993-4の改訂作業の一部として、ISO/TC194 WG9が主体となって、溶血性試験のラウンドロビン試験が進められている。

平成24年 厚労省発出の第20号通知「第8部 血液適合性試験」においては、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の5つの試験項目が挙げられており、それぞれの試験項目について標準的な評価項目が挙げられている（図2）。血栓形成では、付着物/付着状態の観察が標準的な評価項目とされている。血栓形成は血液凝固システムと血小板の活性化が関与していると考えられており、体内循環血液に接触する場合は *in vivo*、体外で血液に接触する場合は *in vitro* もしくは *ex vivo* の評価の実施が考慮される必要がある。血液凝固においては、トロンビン-抗トロンビン複合体（TAT）、フィブリノペプチドA（FPA）、部分トロンボプラスチン時間（PTT）が標準的な評価項目として挙げられている。図3に血液凝固系カスケードと評価項目について示したが、血液凝固系カスケードには内因系と外因系に大別され、TAT、FPAは内因系、PTTは外因系の因子である。PTTは動物血を用いて評価することが可能であるが、TAT、FPAの測定は、免疫検定法（ELISA）が推奨されるため、

ヒトの血液による試験系の設定が必要になる。血小板においては、血小板数、血小板放出因子 (β -トロンボグロブリン (β -TG))、血小板第4因子 (PF4) が標準的な評価項目として挙げられている。血小板の活性化の評価は、血栓形成の指標として重要である。血小板は試験試料表面に接着し、偽足を伸長させて粘着し、凝集反応を行う。血小板には、 α 顆粒、濃染顆粒、リソソームが存在し、活性化に伴ってケモカイン、増殖因子、細胞外基質、粘着タンパク質、凝固制御因子、線溶阻害物質、セロトニン、ADP、ATP 等が放出される。 β -TG、PF4 は共に、 α 顆粒より放出される血小板顆粒物質である。 β -TG、PF4 の測定も ELISA が推奨されるため、使用できる動物種が限定される。血液学的項目においては、全血算 (CBC) 溶血が評価項目として挙げられている。CBC では試験試料曝露後の赤血球数、白血球数、血小板、ヘモグロビン量を測定する。溶血に影響する因子として、化学的因子と物理的因子があり、血液循環に関与する医療機器では物理的影響について考慮する必要があるが、物理的影響を無視できる医療機器に関しては、既に確立されている *in vitro* の試験法を用いて評価することができる。補体系では、補体活性化産物 (C3a、C5a、SC5b-9) が標準的な評価項目として挙げられている。補体活性化の径路には、古典径路、副径路、レクチン径路が知られている。古典径路では、C1、C4、C2、C3 の順に活性化が起こる。レクチン径路では、マンノース結合レクチン (MBL)、MBL 関連セリンタンパク分解酵素 (MASP) が活性化に関与する。図4に副径路を示したが、副径路では C3 から直接活性化が始まる。以下の活性化の径路は3経路共通で、C3 転換酵素により C3 から C3a、C3b を生じ、次に C5 から C5a、C5b が生じ、C5b と C6789 から C5b6789

(C5b-9) 膜侵襲複合体 (MAC) が形成され、SC5b-9 を生じる。評価項目として挙げられている C3a、C5a、SC5b-9 は、3 経路共通の活性化径路部分において、それぞれ C3a が初期、C5a が中期、SC5b-9 が後期の可溶性活性化産物である。血液適合性試験の標準的な評価項目として挙げられているこれらの項目の中から、製品の用途、血液との接触期間等に応じて選択、実施されている。特に、ヒトの血液を用いて実施する試験法については、試験系の適切性、検出感度などについての検証が十分に行われていない。

本研究では、「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」の一環として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の各試験法の国際整合に必要な基礎データの収集を行い、試験の妥当性についての総合的な検証を行うことを目的とする。評価においては、本研究班において、医用材料/細胞界面特性に着目した、生体反応、細胞機能等への影響におけるマーカー検索、分子動力学的シミュレーショングループの研究成果と合わせ、新たな評価手法の開発を目指す。本研究の成果は、新規医療機器の開発及び承認審査の迅速化に寄与するほか、ISO や JIS 規格にフィードバックできる等、厚生行政的にも重要であると思われる。

本年度の研究においては、まず、各試験法の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うための、試験法についての調査、試験実施方法の確認 (キットの選定) 作業を行い、次に、2-methoxyethyl acrylate (MEA)、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) をコートしたシートを用いて、実際に血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について検証を行い、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基

礎的データを収集した。

B. 研究方法

1. 材料

Polycarbonate (PC) シート (34mm、厚さ 0.1mm、菅原工芸) に、MEA:HEMA = 0%:100% (PHEMA)、25%:75% (M25H75)、50%:50% (M50H50)、75%:25% (M75H25)、100%:0% (PMEA) の 5 段階の混合比のポリマー溶液及び MPC ポリマー (Lipidure、日油) 溶液をコートした。コート方法は、1 wt% (MeOH) 溶液を、滴下量 100 μ L でスピンコート (4000 rpm, 10 sec, 表裏各 2 回コート) した。対照シートとして、PC シート (未コート) 及び Polyethylene terephthalate (PET) シート (未コート) を用いた。MEA/HEMA 液は、共同研究者の田中先生より供与いただいた。

2. 血液適合性試験

1) 採血

翼付針 (テルモ、予備試験: 23G、本試験: 21G) を用い、組織因子を含む血液を除くため、まず 5 mL 注射筒 (テルモ) で採血後、50 mL または 30 mL 注射筒 (テルモ、予めヘパリン (田辺三菱製薬) final 2 U/mL 含有) で必要量の血液を採取した。

2) インキュベーション

3 もしくは 4 分割した被験シート 2 枚を重ねないように 15 mL polypropylene (PP) チューブに入れ、6 mL の全血 (6 cm^2 / 1 mL 全血) と 37、2 時間、緩やかに振盪 (60 rpm) した。予備試験では、PET、PC (未コート)、PHEMA、PMEA、MPC シートについて実施し、本試験では、PET、PC (未コート)、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEA、MPC シートについて実施した。予備試験ではチューブを斜めに立てて振盪し、本試験では、チュ

ーブを横にして振盪し、15 分毎にチューブ回し、上下が入れ替わるようにした。

3) サンプルング

インキュベーション開始時及びインキュベーション終了後、各試験項目に応じて血液をサンプルングした (図 3)。血液凝固因子測定用はクエン酸含有チューブ (テルモ)、血小板因子測定用は CTAD (citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole、血小板刺激抑制) 含有チューブ (BD)、補体系測定用には、Futhan (Nafamostat Mesilate (補体分解阻害剤)、鳥居薬品、final 5 μ g/mL) 添加 EDTA-2K 含有チューブ (テルモ) にサンプルングし、図 3 に示す氷中静置、遠心等の処理を行った後、分注して -30 で保存した。溶血性試験は、全血をそのままサンプルングして用いた。

4) 溶血性試験

各時間にサンプルングした全血を、PBS 又は蒸留水と血液を 7:1 で穏やかに転倒混和した。750 x g で 5 分間、冷却遠心し、上清を分取した。PBS で 10 倍希釈し、576 及び 540nm の吸光度を測定した。ASTM 法ではクエン酸処理血、NIH 法ではシュウ酸処理血、MHLW 法では脱繊維血を試験に用い、先に血液を希釈後、接触試験を行い、吸光度を測定することから、参考データとした。溶血率 (%) は、(試験液上清の吸光度 - ブランク) / (完全溶血上清の吸光度 - ブランク) x 100 で算出した。

5) 血液凝固系の測定

TAT の測定は、凍結保存したクエン酸処理血を ELISA (エンザイグノスト TAT micro、SIEMENS) により測定した。

6) 血小板活性化の測定

β -TG の測定は、凍結保存した CTAD 処理血を ELISA (アセラクロム β -TG TMB、Roche) により測定した。

7) 補体系の測定

C3a、C5a、SC5b-9 の測定は、凍結保存

したフサン/EDTA-2K 処理血を、ELISA により測定した。測定キットは、C3a (MicroVue C3a plus EIA Kit、QUIDEL)、C5a (MicroVue C5a EIA Kit、QUIDEL)、SC5b-9 (MicroVue SC5b-9 plus EIA Kit、QUIDEL) を用いた。

5)~7)の ELISA による測定は、キットの添付文書に従って実施した。推奨の希釈により検量線上に値が乗らない場合は、希釈倍率を変更し再検討を行い、全サンプルを同じ希釈倍率で測定した。

3. V79 細胞を用いた細胞毒性試験

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い細胞毒性試験を実施した。

1) 細胞株および培養方法

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞V79は、JCRB細胞バンク(吹田)より入手した。V79細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化FBS)、Penicillin-streptomycinを含むMinimum Essential Medium (MEM) (GIBCO)にて、37°C、5% CO₂-95% airインキュベーターで培養した。細胞株は、3-4日ごとに継代した。細胞毒性試験に際しては、培地に Amphotericin Bを添加して実施した。

2) 抽出方法

UV滅菌(5 min x 2)した被験シート(PC(未コート)、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEA)各4枚を、3もしくは4分割し、乾熱滅菌したガラス容器に入れた。6 cm² / 10 mLとなるように培地を入れ、乾熱滅菌したシリコンシートを挟んでスクリーキャップで蓋をした。37°C、5% CO₂-95% air インキュベーターに24時間静置した。ガラス容器から取り出した抽出液を、100%試験液とし、培地にて2倍希釈系列を作成し、細胞毒性試験に用いた。

抽出液の色から、培地のpHが中性域であることを確認した。

2) 細胞毒性試験・コロニー法

V79細胞を50 cells / 0.5 mLで24-wellプレートに播種した。翌日、培地を除き被験液を添加し、さらに4日間静置培養した。その後、ギムザ染色してコロニーを計測し、陰性対照群のコロニー数に対する割合(コロニー形成率)を算出した。試験は、0、6.25、12.5、25、50、100%試験液について実施した。陽性対照物質としてZinc diethyldithio carbamate (ZDBC)を用いた。

3) 細胞毒性試験・MTS法

V79細胞を96-wellプレートに播種し(1 × 10⁴ cells / 0.1 mL / well)、24時間後に被験液0.1mLを添加し、さらに24時間及び48時間培養した。培地を除去後、100 μLのPhenol Red-free MEM培地及び20 μLのCellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega)を添加し、5% CO₂インキュベーターで37°C、1時間反応した。生成されるフォルマザンをマイクロプレートリーダー(490 nm)で測定し、対照群に対する割合(生存率)を算出した。試験は、0、3.13、6.25、12.5、25、50、100%試験液について(final 0、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50%)実施した。陽性対照物質として、ZDBCを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト全血を用いることから、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会に申請を出し、承認を受けた上で実施した。試験に用いる材料として、本研究グループにおいて検討に用いている、既存の陽性及び陰性材料と生体適合性の優れた新規材料を用い、収集する基礎データが、新規評価手法の開発にも役立つよう配慮した。

C . 研究結果

1. PHEMA、PMEA、MPC シートを用いた予備試験

予備試験では、PET、PC (未コート)、PHEMA、PMEA、MPC シートについて血液適合性試験を実施し、0 時間 (シートなし) 及び 2 時間インキュベーション後のサンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として β -TG の測定、補体系の評価項目として、C3a 及び SC5b-9 の測定を行い、後から C5a の測定を追加した。

表 1 に溶血試験の結果を示した。いずれのシートも溶血率は 2% 以下であり、溶血性なしと判定された。ABS 540 nm においても ABS 576 nm と同様の結果が得られた (data not shown)。凍結保存しておいた血液サンプルを用いて、ELISA 法により TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。サンプルはそれぞれ検量線に乗るように希釈して実施した (TAT : x 1、 β -TG : x 1050、C3a : x 2000、C5a : x 50、SC5b-9 : x 10)。図 6 に TAT 及び β -TG の結果を示した。2 時間インキュベーション後、シートなしでは TAT が低く、次いで PMEA、MPC がシートなしの 4 倍程度、PET、PC (未コート) が 6 倍程度、PHEMA が一番高く 8 倍程度であった。 β -TG では、PMEA はシートなしよりも低く、次いでシートなし、PHEMA、MPC が PMEA の 2 倍程度、PET、PC が高い値を示し、PC が一番高かった。補体系について測定した結果を図 7 に示した。当初 C3a 及び SC5b-9 を測定したが、C3a においては、2 時間インキュベーション後、PHEMA が一番高かったものの、シートなし、PET、PC (未コート)、PHEMA、PMEA、MPC のすべてにおいて高い値が得られ、SC5b-9 の結果と異なっていたことから、C5a の ELISA キットを追加入手

して測定した。SC5b-9 では、シートなし、PET、PC (未コート)、PMEA、MPC で値に大きな差はなく、PHEMA においてのみ高い値が得られた。C5a に関しては、全体に血漿中における量が少なかったが (添付の血漿コントロールにおいても同様)、シートなし、PMEA が同程度で低く、MPC が中間、PET、PC (未コート)、PHEMA がシートなしの 1.6-1.8 倍高いという結果が得られた。

2 . 混合比の異なる MEA/HEMA シートを用いた本試験

予備試験の結果、被験シートを用いて血液適合性試験の各試験項目測定が可能であることが分かったので、サンプル数を増やして、混合比の異なる MEA/HEMA シートに対する試験を実施した。PET、PC (未コート)、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEA、MPC シートについて実施し、0 時間 (シートなし) 及び 2 時間インキュベーション後のサンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として β -TG の測定、補体系の評価項目として C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。

表 2 に溶血試験の結果を示した。予備試験同様、いずれのシートも溶血率は 2% 以下であり、溶血性なしと判定された。ABS 540 nm においても ABS 576 nm と同様の結果が得られた (data not shown)。次に、凍結保存しておいた血液サンプルを用いて、ELISA 法により TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。サンプルはそれぞれ検量線に乗るように希釈して実施した (TAT : x 10、 β -TG : x 420、C3a : x 300、C5a : x 60、SC5b-9 : x 20)。図 8 に TAT 及び β -TG の結果を示した。TAT は予備試験に比べて被験シート群で高い値が得られた。TAT 及び β -TG では、混合比の異なる

MEA/HEMA シート間で M50H50、M75H25 が低く大まかな傾向が似ていた。補体系について測定した結果を図9に示した。C3aにおいては、予備試験と同様に、2時間インキュベーション後、シートなし、PET、PC（未コート）、MEA/HEMA シート、MPCのすべてにおいて高い値が得られた。その中では僅かであるが PHEMA が一番高かった。C5aでは、シートなし、M75H25、PMEA、MPCが同程度で低く、次いで、M25H75、M50H50が同程度、PET、PC（未コート）、PHEMAの順に高くなった。C5aでも PHEMA が一番高かった。SC5b-9では、シートなし、PMEAが低く、次いで MPC、PC（未コート）、M75H25、PET、M50H50、M25H75、PHEMAの順で高くなり、PHEMAはシートなしの3.4倍高いという結果が得られた。

3. V79細胞を用いた細胞毒性試験

V79細胞を用いて、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い細胞毒性試験を実施した結果、コロニー法において PC（未コート）、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEAすべてのシートにおいて、100%試験液を含むいずれ濃度においても細胞毒性は観察されなかった（図10）。また、MTS法においても、100%試験液（final 50%被験液）を含むいずれの濃度においても、細胞毒性は観察されなかった（図11）。オプションとして、MTS法において、コロニー法と同様に、96 wellから培地を除き、0.1 mLの100%試験液又は培地を添加して、24及び48時間後にアッセイを行ったが、細胞毒性は観察されなかった（data not shown）。

D. 考察

血液適合性試験の実施において、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補

体系において標準的な評価項目として挙げられていたもののうち、TAT、FPA、 β -TG、PF4、C3a、C5a、SC5b-9の測定には免疫検定法（ELISA）が推奨されるため、使用できる動物種が限定される。これらの項目に対する ELISA キットがヒトの臨床検査用に開発されているものが多いことから、ヒトの血液による試験系の設定が必要になる。標準的な評価項目として挙げられている因子や活性化産物が分解しやすいなど、半減期が短いことから、それぞれの測定項目に合わせたサンプリングが必要となった。今回、血液凝固因子測定用にはクエン酸処理、血小板因子測定用には CTAD 処理、補体系測定用には EDTA、Futhan 処理を行ったサンプルを用いて測定を行った結果、実際にこれらの処理により ELISA で検出可能で、各因子や活性化産物が分解していないことが確認でき、また、被験試料により値に差が観察できた。

被験試料と血液とのインキュベーションを行うにあたり、ガラスチューブについても検討を行ってみたが、ガラスチューブではシートなしでインキュベーション1時間目血栓が観察された。今回の実験では、PP チューブを用いて試験を実施したが、試験に用いるチューブの材質の影響についての検討、タイムコースなど基礎的なデータを取る必要がある。また、採血時に、組織因子を含む血液を除くため、初めの3-4 mLを別の注射筒で取ってから試験用の採血を行ったが、組織因子を含む血液が、*in vitro*の血液適合性試験において、実際にどの程度影響があるかについても確認しておく必要があると思われる。

本研究の2回の血適合性試験の結果について比較したところ、TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9の5項目に関しては、2回の試験の値のオーダーが揃っていたが、TATについては予備試験に比べて、本試験では

全体に値が高く、共通に被験シートがあるものでデータを比較してみると、シートなしで6.5倍、他ではPMEA3倍～PET9倍の差があった。この理由として、予備試験と本試験において、採血方法、インキュベーション時における振盪方法等を変更しており、それらが影響している可能性が考えられた。また、採血時の血液の状態などが、特定の因子の活性化に關与している可能性も考えられる。今後、追試験等を進めていくことで、各評価項目に影響を与える要因について、背景データ、被験物質に対する感受性の違いなどについて情報を得ることが出来るのではないと思われる。

2回の試験において、共通にデータが得られているシートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの結果について比較検討した。TATでは、シートなしが低く、PMEA、MPCがPET、PC（未コート）、PHEMAに比べて低い傾向は共通であった。β-TGでは、シートなし、PMEA、MPCが他の被験シートに比べて低いという結果は共通であった。C3aでは、0時間のみが低く、2時間インキュベーション後、シートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの値はいずれも高かったが、その中では、PHEMAが一番高いという結果が共通していた。C5aでは、シートなし、PMEA、MPCが他の被験シートに比べて低く、PHEMAが一番高いという結果が共通していた。SC5b-9については、シートなし、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPCの結果がほとんど一致しており、PHEMAの値だけが高く、他のデータの順はPMEA、MPC、シートなし、PC（未コート）、PETの順で共通していた。2回の試験の比較においては、5項目において、一部結果が異なる場合もあったが、全体に共通の結果が得られており、その中でも補体系の3項目は再現

性が高い結果が得られていた。

混合比の異なるMEA/HEMAシートを用いた本試験における5項目の測定結果を比較検討した。C3aを除くTAT、β-TG、C5a、SC5b-9において、MEA/HEMAの混合比と測定結果との間に關連が見られ、その傾向は2種類に大別された。TAT、β-TGでは、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25の順に値が小さくなる傾向があり、PMEAではM50H50、M75H25に比べると高い値になり、U字カーブを描いていた。これに対して、C5a、SC5b-9では、PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25、PMEAの順に値が小さくなる傾向があり、右下がりのカーブを描いていた。PHEMA、M25H75、M50H50、M75H25間でHEMAの比率が増えるに従って値が増加する傾向は、TAT、β-TG、C5a、SC5b-9の4項目において、共通に觀察された。

今後は、試験に用いるチューブの材質の影響についての検討、タイムコース、組織因子を含む血液の影響等、各試験法の特性について検証を進めるための基礎的なデータの収集を続ける予定である。C3aに関しては、補体系の中でも3径路により活性化されC3a、C5a、SC5b-9の中でも初期の産物であることから、活性化が起こりやすい可能性が考えられた。今後、C3aに加えて、C3a-desArgのELISA等も検討してみる予定である。混合比の異なるMEA/HEMAシートを用いた試験については、再現性について確認試験を行う。引き続きPMEA、PHEMA、MPCポリマー等の高分子材料に対して、血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について検証を行い、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的なデータを収集する予定である。

E. 結論

本研究において、血液適合性試験の各評

価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、次に、混合比の異なる MEA/HEMA、MPC 等の高分子材料を被験試料として、実際に、血液適合性試験を実施した結果、

- TAT は両試験間で、値が異なっていた。
- TAT 及び β -TG では、大まかな傾向が似ていた。
- C3a、C5a、SC5b-9 では、両試験で結果がほぼ一致していた。
- C3a では、2 時間のインキュベーションによりシートなしでも値が上昇し、被験試料による差はほとんど観察されなかった。
- C5a、SC5b-9 では、特定のシートにおいて上昇が観察された。
- MEA/HEMA の混合比を変えたシート間では、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9 で HEMA の比率が増えるに従って値が増加する傾向が観察された。

今後、引き続き MEA、HEMA、MPC 等の高分子材料に対して、血液適合性試験を実施し、各試験法の特徴、妥当性について検証を行い、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

一方、混合比の異なる MEA/HEMA シートについて、医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、抽出法により V79 細胞に対する細胞毒性試験を実施した。その結果、いずれの混合比の MEA/HEMA シートにおいても細胞毒性は認められなかった。

本研究の遂行にあたり、血液適合性試験の実施方法についてご指導いただきました、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性学研究室の新藤智子先生に感謝

致します。

F. 研究発表

1. 論文発表

Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A., Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos J. Toxicol. Sci. (in press)

2. 学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)
- 2) 宮島敦子、加藤玲子、小森谷薫、新見伸吾：生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）
- 3) 加藤玲子、薮島由二、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（船堀、2013.11）
- 4) 加藤玲子、佐藤正人、岡田恵里、阿久津英憲、小久保舞美、河毛知子、宮島敦子、梅澤明弘、持田譲治、新見伸吾：多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響 第 27 回日本軟骨代謝学会（京都、2014.2）

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【試験ガイドライン】

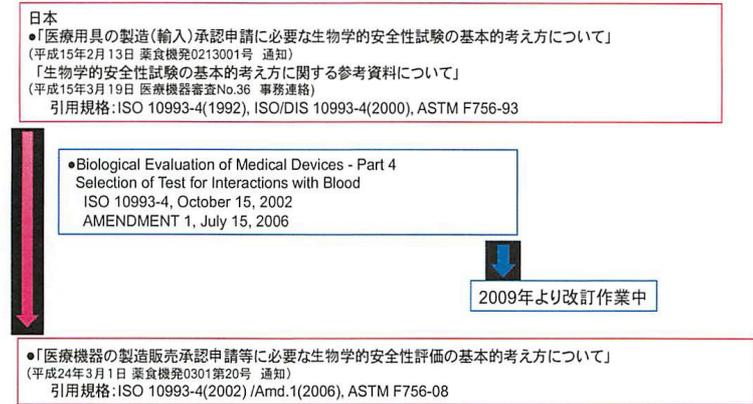


図1 血液適合性試験に関する通知

試験項目	評価項目
1 血栓形成	付着物/ 付着状態
2 血液凝固	トロンビン-抗トロンビン複合体(TAT)
	フィブリノゲン(FPA)
3 血小板	部分トロンボプラスチン時間(PTT)
	血小板数
	血小板放出因子(β -トロンボグロブリン(β -TG))
4 血液学的項目	血小板第4因子(PF4)
	全血算(CBC)
5 補体系	溶血
	補体活性化産物(C3a)
	補体活性化産物(C5a)
	補体活性化産物(SC5b-9)

「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」
(薬食機発0301第20号 平成24年3月1日)より

図2 血液適合性試験における標準的な評価項目

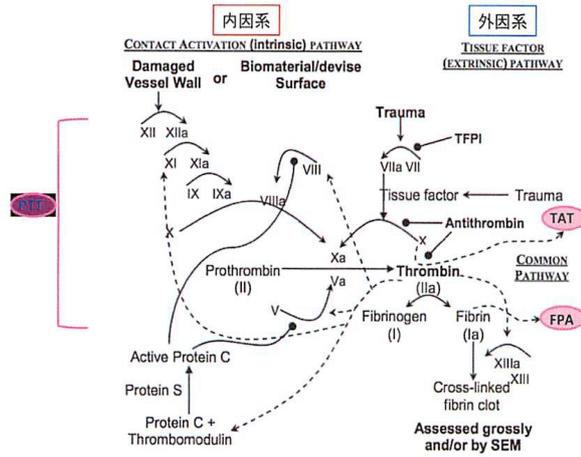
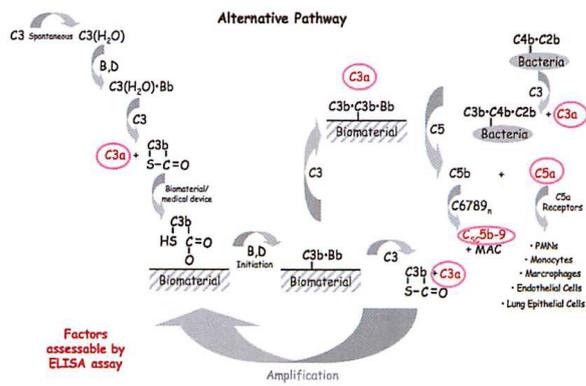


Figure B.1 — The coagulation cascade

ISO/WD 10993-4(2013)に追記

図3 血液凝固系カスケードと評価項目



ISO/WD 10993-4(2013)に追記

図4 補体系と評価項目

ヒト全血(ヘパリン2 U/mLを含む)と被験試料(6 cm² /1mL血液)を、37℃、2時間、緩やかに振盪(60 rpm)後、各試験項目に応じて血液をサンプリング。

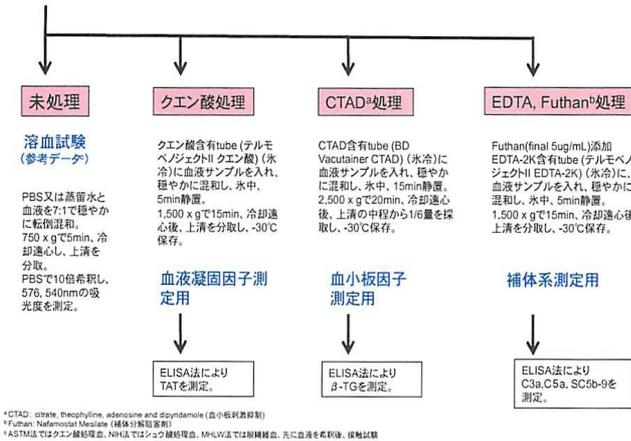


図5 血液適合性試験の実施方法の概略

表1 予備試験における溶血率

	ABS (576nm) mean		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.035	0.895	
no sheet	0.033	0.995	
PET	0.036		0.26
PC	0.033		0.00
PHEMA	0.034		0.05
PMEA	0.034		0.05
MPC	0.030		0.00

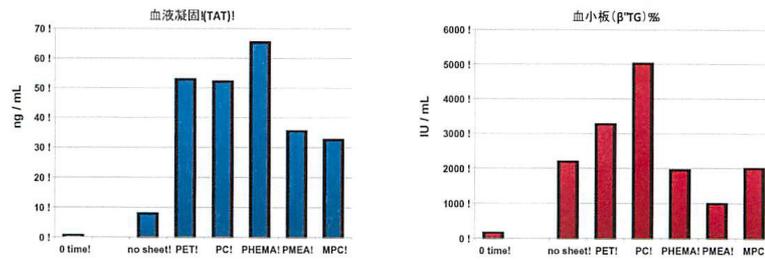


図6 予備試験における血液凝固系(TAT)及び血小板(β-TG)の活性化

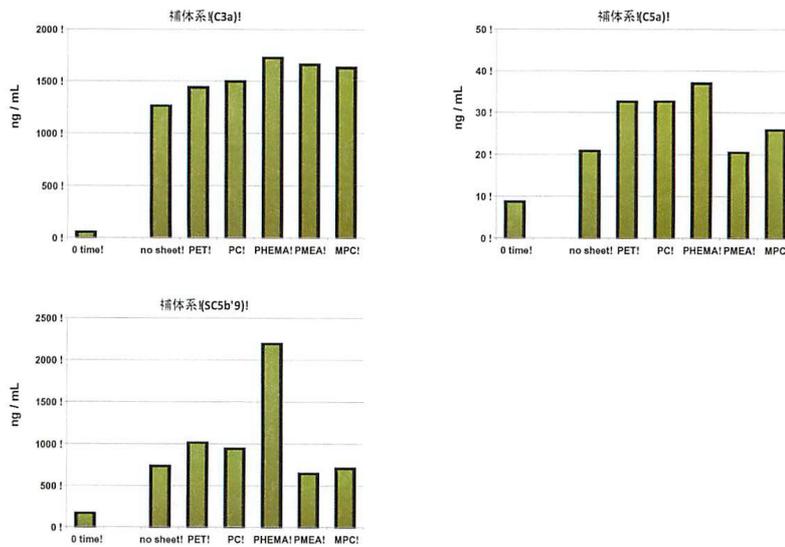


図7 予備試験における補体系(C3a, C5a, SC5b-9)の活性化

表2 本試験における溶血率

	ABS (576nm) mean		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.034	0.923	
no sheet	0.033	0.965	
PET	0.033		0.00
PC	0.035		0.16
PHEMA	0.040		0.70
M25H75	0.035		0.21
M50H50	0.036		0.27
M75H25	0.034		0.11
PMEA	0.035		0.16
MPC	0.035		0.16

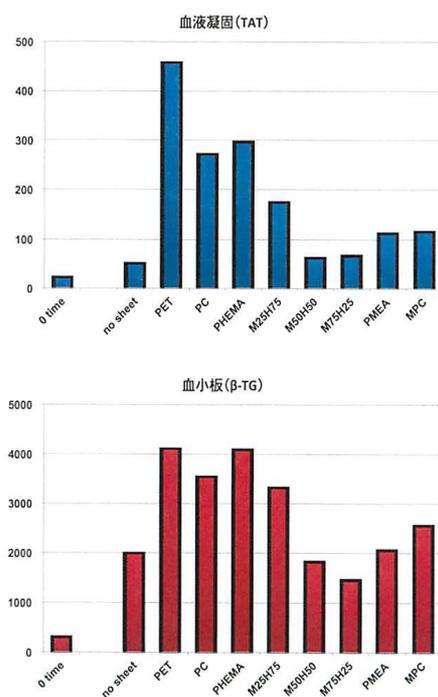


図8 本試験における血液凝固系(TAT)及び血小板(β-TG)の活性化

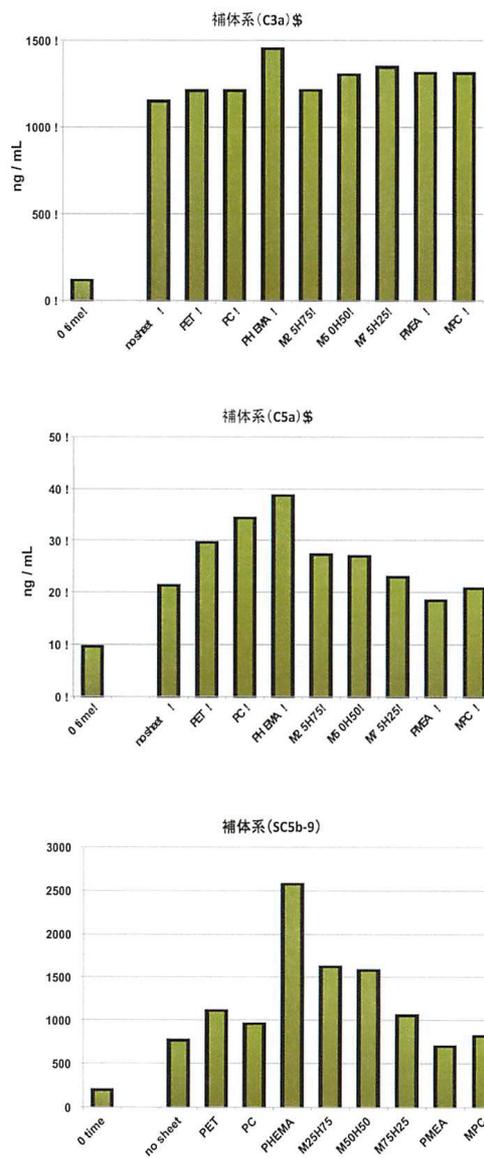


図9 本試験における補体系(C3a, C5a, SC5b-9)の活性化

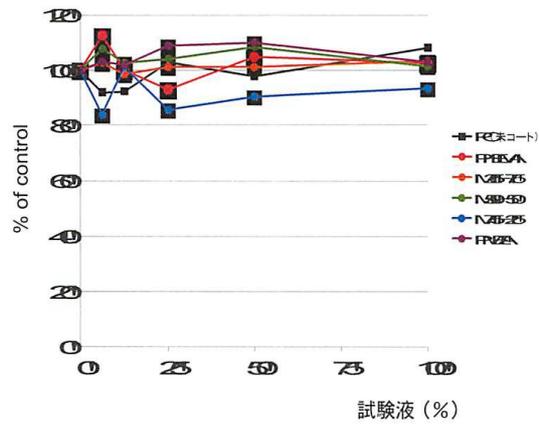


図10 V79細胞を用いた細胞毒性試験(コロニー法)

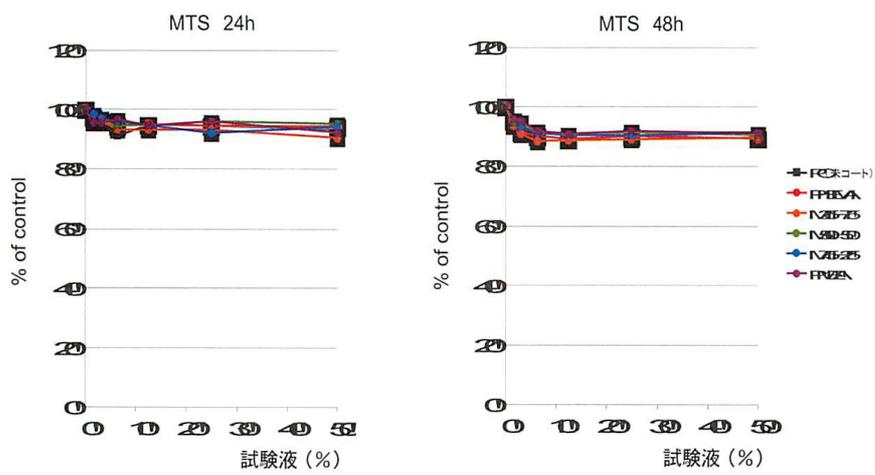


図11 V79細胞を用いた細胞毒性試験(MTS法)

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
細胞内タンパク質発現解析を利用した医用材料の血液適合性評価に関する研究

研究代表者	新見伸吾	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
研究分担者	加藤玲子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
研究協力者	配島由二	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
研究協力者	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

近年、材料表面構造の違いが、その表面上へのタンパク質を始めとした種々の分子の吸着挙動の違いを生じさせ、その結果、細胞の接着や活性化などに影響を与えることが示唆されてきている。本研究では、材料表面構造の違いが、細胞の特性にどのような影響を与えるか、タンパク質発現の観点から検討することを目的とする。そのために、表面特性の異なる材料上で細胞を培養し、相互にタンパク質の発現の違いを比較しつつ、材料の生物学的特性との相関性を検討する。今年度は、細胞培養用シャーレ (TCPS) を対照として、ポリカーボネート (PC) シート、および PC シートをポリ-2-メトキシエチルアクリレート (PMEA) もしくはポリ-2-ヒドロキシエチルメタアクリレート (HEMA) でコーティングした上でヒト単球細胞である THP-1 を培養し、そのタンパク質発現の比較を行った。その結果、PC シート上で培養した THP-1 では、血液凝固に関わるタンパク質、炎症に関与するサイトカインやケモカイン、および細胞形態や接着に関与するタンパク質の発現が二倍以上高くなっていた。これらのタンパク質は HEMA でコーティングでは、対照と比してほとんど変化がなく、PMEA コーティングではやや低い傾向が見られた。以上のことより、基材を PMEA もしくは HEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応などを制御できることが示唆された。

A. 研究目的

人工血管や人工透析膜、人工心臓やカテーテルといった医療機器は、血液と接触することから血液適合性に優れていることが必要とされる。一般に、医療機器が生体内に埋植されると、直ちに材料表面にイオンや水が吸着し、そのあと生体内のタンパク

質や多糖が吸着してくる。表面特性が異なれば、結合する生体分子の種類や量も異なると考えられる。一方、細胞は直接材料表面に結合するのではなく、吸着し変性したタンパク質などを介して材料と相互作用するため、材料の表面構造の違いが細胞自身の挙動に影響をおよぼし、これが生体適合

性の違いを生み出す一因になると考えられる。PMEA および PHEMA は他の類似ポリマーに比べてタンパク質の吸着が少なく、生体適合性が高いことから、それぞれに様々な埋植医療機器のコーティングやソフトコンタクトレンズなどの材料として広く用いられている。そこで昨年度、MEA/HEMA ランダム共重合体の組成比の違いが、間葉系幹細胞に及ぼす影響について検討した結果、コーティング表面上への吸着タンパク質の種類や量を変化させることを介して、間葉系幹細胞の細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群の発現に影響をおよぼすことが示唆された。

PMEA および PHEMA は血液適合性に優れているという報告があることから、本年度は、検討細胞を血液球系細胞である THP-1 細胞にし、PMEA および PHEMA が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかをタンパク質発現に焦点をおいて検討した。

B. 研究方法

1. 材料

シート：厚さ 0.1 mm, 径 35 mm の菅原工芸製 Pre-coated ポリカーボネートシート (ポリカーボネート 薄物) (以下 PC と表記)

ポリマー溶液： PMEA と PHEMA

2. ポリマーコーティングシートの作製

スピンコーターの設置台上に PTFE メンブレンフィルターをのせ、その上にメタノール溶液で洗浄した未処理 PC を置き、4,000 rpm, で回しながら、その中央に 1 w/v% メタノール溶液の PMEA もしくは PHEMA を 100 μ l 滴下し、4,000 rpm, 10 sec にてコーテ

ィングした後、乾燥させた後、再度同条件に計二回コーティングしたシートを実験に用いた。

3. 細胞培養

THP-1 (Human acute monocytic leukemia : 急性単核球性白血病由来) は、10% FBS/0.05mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 中で二週間以上、前培養したものを使用した。6 well, cell culture plate (TCPS; Costar) 上、もしくは TCPS に各コーティングシートを静置した上に RPMI1640 を入れ、一度その培地を抜き取った後、各コーティングシート上に THP-1 を 5×10^5 細胞/2 ml で播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37 °C で二日間培養した。

4. 細胞形態表面観察

細胞形態は位相差倒立顕微鏡 (LEICA DM IL; Laica) を用いて観察した。

5. 細胞タンパク質の回収

各コーティングシート上で培養した細胞は 15ml チューブに回収し、遠心した後、10 ml の冷 PBS で 1 回洗浄後、上清を捨て、1ml の冷 PBS に懸濁し 1.5ml に移し、遠心後、同じ操作を二回繰り返して、洗浄した。洗浄後、Complete Protease inhibitor Cocktail (Roche) を含む Protein Extraction Reagent type 4 (SIGMA) に溶解した。遠心分離により不溶物を除去し、2D clean-Up Kit (GE Healthcare) を用いてタンパク質を精製した後、Protein Extraction Reagent type 4 に再溶解し、2D-Quant (GE Healthcare) によりタンパク質量を測定した。得られたタンパク質試料は試験に供するまで -80 °C にて凍結保存した。

6. MS 解析用ペプチド試料の調製

上記のようにして調製したタンパク質各 10 µg を常法に従って、還元 (リン酸トリブチル), アルキル化 (ヨードアセトアミド) した。この溶液 16 µl に 50 mM NH₄HCO₃ (77.2 µl)、ProteaseMax Surfactant (1%, 5 µl; Promega)及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 1.8 µl; Promega)を添加し、37 °C で 3 時間インキュベーションした後、10% トリフルオロ酢酸 (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 OMIX Tip (C18, 100 µl: VARIAN 社)を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant)にて乾燥させた後、0.2 µg/µl の濃度になるように TFA 含有 2%アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析するまで 4 °C で保存した。

7. LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ/Orbitrap Elite (Thermo Scientific)を使用し、測定前に Tyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。Nano-LC としては、HTC-PAL オートサンプラー (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 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm; CERI)、L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3 µm, 12 nm; CERI) 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 Captive Spray イオン源 (AMR) を使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 kV) により行った。スキャンデータ (MS スペクトル) は FT analyzer (分解能 30,000; 測定質量範囲 m/z 300-1,400;

Lock mass = シロキサン及びフタル酸ジエチルヘキシル; Profile mode) により取得し、XCalibur data dependent mode により、各スキャンにおけるイオン強度の高い 3 種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間は 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1%ギ酸) 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。また、次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。測定の繰り返し数は n=2 とした。

分析終了後、得られた MS データに基づいて作成した Reject Mass List (8 参照) を Method File に登録し、同様の分析を更に 2 回繰り返すことにより、MS/MS データを取得するペプチド数を増加させた。

8. タンパク質の同定と定量

8-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データをタンパク質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア v1.3 (PD1.3) (Thermo Scientific) にアップロードし、Mascot 検索 Work

Flow/UniPort/Swiss-Prot データベースを利用してタンパク質同定を行った後、同定された全てのペプチドサーチ結果を Reject Mass List に指定した。リテンションタイムトレランスは± 5 分に設定した。

8-2. 比較定量解析

タンパク質の多変量解析は SIEVE2.0 ソフトウェア (Thermo Scientific) を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群を同ソフトウェアにインストールし、標的イオンの m/z とリテンションタイムの相同性に基づいたピークマッチングを行い、PD1.3 により同定したタンパク質情報をインストールして、多変量解析をおこなった。

8-3. オントロジー解析とパスウェイ解析

タンパク質への機能情報付加とパスウェイ解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) と UniProtKB を用いて行った。

9. 倫理面への配慮

研究に用いた THP-1 はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入しており、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

(1) 播種後の細胞の形状

播種して 48 時間後での THP-1 の形態を図 1 に示す。PMEA および PHEMA コーティングシート上で培養した THP-1 の形態は TCPS 上で培養した THP-1 と同様にほぼ球形で浮遊していた。これに対して、未処理の PC 上で培養した THP-1 は、ほとんどが球形で浮遊していたが、中には扁平で PC 上に接着している細胞も混在していた。(図 1 : 矢印)

(2) タンパク質発現比較解析

得られた MS データを SIEVE2.0 ソフトウェアを用いたデータベース検索した結果、 $p < 0.05$ のタンパク質が 4804 個ヒットしてきた。その内、TCPS 上の培養に対して発現量が 2 倍以上になったタンパク質は PC で 4087 個、PMEA で 11 個、PHMEA で 19 個であった。一方、発現量が 1/2 以下に減少したタンパク質は PC で 7 個、PMEA で 591 個、PHMEA で 35 個であった。(表 1)

表 2 に補体因子・血小板凝集・血液凝固・線溶系に関連するタンパク質群の発現挙動を示している。TCPS 上で培養した THP-1 と比較して未処理の PC 上で培養した THP-1 では、関連タンパク質のほとんどで有意に二倍以上の発現上昇がみられるのに対して、PMEA コートした上で培養した THP-1 では減少傾向、もしくは PHMEA でコートした上で培養した THP-1 では、ほとんど影響を受けていなかった。例えば、外因子系凝固反応の開始部分で働く組織因子は検出されていないが、血小板凝集の足場になるコラーゲンや、そのコラーゲンに付着し、さらに血小板をリクルートしてくる von Willebrand factor、引き続きおこる血液凝固に関連する凝固因子 V, VII の発現が PC 上で培養した THP-1 で有意に上昇が見られた。一方、トロンピンは検出されなかったが、IPA を用いたパスウェイ解析より、PC 上で培養した THP-1 では、トロンピンシグナル関連タンパク質の発現が有意に上がっていることが分かった。(図 2) これらの関連タンパク質は PHMEA でコートした上で培養した THP-1 では、ほとんど影響を受けておらず、PMEA コートでは減少傾向がみられた。(表 3)

フィブリノーゲンおよびフィブリンは検出されていないが、Fibrinogen silencer_binding protein が、PC 上で培養した THP-1 で有意に発現上昇していた。(表 2) 凝固制御系では、アンチトロンピンやプロテイン C の発現は検出できていないが、Protein Z_dependent protease inhibitor が PC と PHEMA 上で培養した THP-1 で発現の亢進が見られた。線溶系関連タンパク質では血栓を溶かす作用のあるプラスミンとともに、その線溶阻止物質である Plasminogen activator inhibitor 1 RNA_binding protein の発現も PC で亢進していた。さらに PC 上で培養した THP-1 では、血小板活性化因子群も発現上昇がみられた。内因系凝固反応系で接触因子として働く高分子キニノゲンのレセプターコンプレックス C1QBP に含まれるケラチンタイプ II 細胞骨格 1 が PMEA および PHMEA でコートした上で培養した THP-1 で有意に発現減少していた。

また、全身の血管内で血液凝固反応が無秩序に起こる播種性血管内凝固症候群では、凝固反応の開始因子として High mobility group protein1(HMGB1)やヒストンが働くことが報告がある。これらのタンパク質は PC 上で培養した THP-1 で発現上昇が見られた。

一方、感染症時などでは、内皮細胞だけでなく、単球やマクロファージも刺激され、血液凝固開始に重要な役割を果たす組織因子を発現するようになる。このように、炎症と血液凝固の間に関連性があることから、表 4 に炎症・遊走に関連するタンパク質群の発現挙動を示した。種々のインターロイキン、インターフェロン、Tumor necrosis factor やケモカイン関連タンパク質や Toll like receptor-3,-7,-8、アラキドン酸産生に働

くホスホリパーゼ A、さらにアラキドン酸カスケードの作用で産生されるプロスタグランジン類やロイコトリエン類に関連するタンパク質、血小板凝集に働くホスホリパーゼ C などの発現も PC 上で培養した THP-1 で二倍以上の発現亢進がみられた。

さらに顕微鏡観察において、PC 上で培養していた THP-1 に形態変化が観察されたことから、細胞骨格・伸展・接着関連タンパク質群の発現挙動を表 5 に示した。細胞骨格タンパク質のミクロフィラメントを形成しているアクチン関連タンパク質、アクチン結合タンパク質であるフィラミン・ミオシン・トロポミオシン関連タンパク質、さらに中間系フィラメントである、ラミン、ビメンチン、微小管形成タンパク質でチューブリンおよび微小管関連タンパク質が PC 上で培養した THP-1 で二倍以上の上昇が見られた。それらのタンパク質は、TCPS 上で培養した THP-1 と比較して PMEA では減少傾向、PHEMA ではほとんど変わらなかったが、トロポミオシン関連タンパク質で発現低下が見られた。一方、細胞の裏打ちタンパク質である、テーリン、ピンキュリン、アクチニン関連タンパク質や細胞膜貫通の細胞接着分子であるラミニン類も PC 上で培養した THP-1 で発現が亢進していた。また、血管内皮との接着に重要な LFA-1 や VLA-4 を含む種々のインテグリンの発現も PC 上で増加が見られた。

D. 考察

本研究では、表面構造の違いが THP-1 に与える影響を細胞のタンパク質発現レベルで検討する目的で、通常の培養皿である TCPS を対照として、基材(PCシート)お

よび血液適合性が高いと報告のある PMEA もしくは PHEMA でコーティングした PC シートの上で培養した THP-1 のタンパク質発現の網羅的解析を行った。

まず、播種して 48 時間後の THP-1 を顕微鏡観察したところ、TCPS 上では接触面で接着はせずに物理的に触れている状態であった。しかしながら未処理の PC 上では、シートの接触面に接着している細胞や接着はしていないが突起を出している状態の細胞が一部観察された。もともと THP-1 は未刺激では浮遊している細胞であるが、ホルボールエステルやリポポリサッカロイドなどで刺激されるとマクロファージ様の細胞に変化し接着するようになる。つまり、THP-1 は未処理の PC 表面から何らかの刺激を受けた可能性が考えられる。一方、各コーティングシート上で培養した THP-1 は TCPS と同様に接触面で触れている状態であった。これは PMEA や PHEMA コーティングにより、表面構造が変わったこと、さらに表面上への吸着タンパク質の種類や量が変化したこと（H24 年度本報告書葎島の項、研究結果(2) 吸着蛋白質の解析を参照）が影響していると考えられる。

一方、敗血症性播種性血管内凝固症候群は全身の血管内で血液凝固が起こり、その結果、微小血栓が多発する症候群である。その凝固活性化のイニシエーターとしては、病原体由来のエンドトキシン、炎症性のサイトカインや HMGB1 が考えられている。これらの因子が単球・マクロファージや血管内皮細胞の表面に組織因子を発現させ、凝固反応が開始する。このように、炎症と血液凝固との間には関連があることが知られている。THP-1 は単球系の細胞であるこ

とから、接触面の表面構造の違いによる影響から、何らかの刺激を受け炎症反応と類似した活性化状態になっている可能性が考えられた。そこで、補体因子・血小板凝集・血液凝固・線溶系および炎症・遊走・細胞骨格・伸展・接着に関連するタンパク質群に着目し、その発現挙動を TCPS 上で培養した THP-1 を対照として検討したところ、未処理の PC 上での培養で、そのほとんどのタンパク質が発現上昇（平均 3.09 倍）していた。一方、コーティングしたシート上で培養した THP-1 の上記関連タンパク質の発現は、PMEA では、減少傾向（平均 0.81 倍）がみられ、PHEMA では、ほぼ変化なかった。（平均 1.03 倍）これらのタンパク質の中には Fibrinogen silencer binding protein や Protein Z dependent protease inhibitor といった凝固に抑制的に働くタンパク質や血栓溶解作用のあるプラスミンといったタンパク質が PC 上で有意に発現上昇していたが、これは一連のパスウェイが動くと、その制御機構として、連動して発現挙動に変化が起る結果なのかもしれない。

PMEA も PHEMA もタンパク質吸着が比較的少ないが、PMEA の方が吸着タンパク質を脱離しやすく、また変性しにくいこと、さらに PMEA には中間水が存在するが、PHEMA には存在しないことが知られている。これらの性質の違いが、PMEA は TCPS に比べて減少傾向がみられているが、PHEMA はほとんど発現パターンが変わらないという、今回の結果の差に関連があるのかもしれない。今後、組成比の違う MEA/HEMA ランダム共重合体でコーティングした上で培養した THP-1 でのタンパク質発現を、相互に比較検討する必要がある。

PC 上で培養した THP-1 は一部接着していることが観察されていたが、今回のサンプル調製では、浮遊している細胞しか回収していなかったため、接着している細胞も含めてサンプル調製すると、今回より大きな差がみられる可能性がある。また、液性因子など、今回のサンプル調製では取りこぼしているタンパク質群もあることから、遺伝子発現解析の結果を参考にすることや、細胞上清からタンパク質精製など、サンプル調製を工夫することで、これらの問題を解決できると思われる。

E. 結論

今回の結果から、基材を PMEA もしくは PHEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応なども制御できる可能性が示唆された。また、その傾向は PMEA の方が強かった。

F. 研究発表

学会発表

1. Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals.
Eurotox 2013 (2013.9)

2. 澤田留美, 河野健, 加藤玲子, 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(1): 遺伝子発現の網羅的解析」
第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

3. 加藤玲子, 配島由二, 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 (2013.11)

4. 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾「生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答」

第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

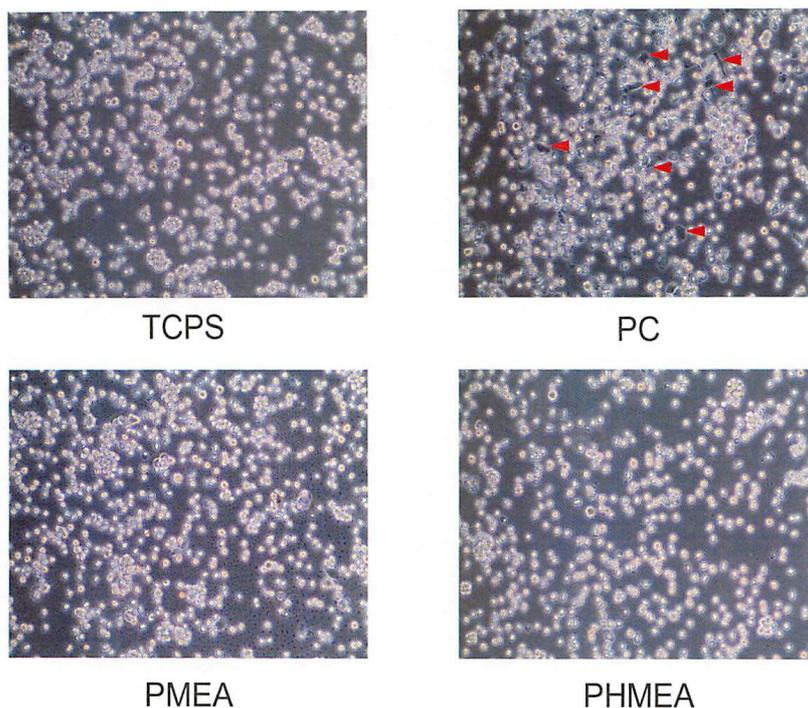


図1. 播種48時間後の細胞形態

表1. TCPS上での培養と比較してTHP-1での発現が変化したタンパク質数

Fold Change (vs TCPS)	PC	PMEA	PHEMA
5倍以上	190	1	1
2倍以上5倍未満	3897	10	18
1/5以上1/2以下	5	51	29
1/5未満	2	8	6
発現変化のあったタンパク質数	4094	70	54

表2.タンパク質比較定量解析結果:血液凝固・線溶系関連タンパク質群

■ : 2倍以上 □ : 5倍以上

Protein name	Peptides	Frames	Hits	Rslative reation (sample/TCPS)			
				TCPS	PC	PMEA	PHEMA
Complement factor H	1	1	1	1.00	2.02	1.06	1.29
Complement component 1 Q subcomponent_binding protein_mitochondrial	1	1	1	1.00	8.71	1.04	1.36
Complement component C8 gamma chain	1	1	1	1.00	3.31	0.77	0.90
Complement factor H_related protein 5	1	1	1	1.00	3.26	0.95	1.16
Complement component C1q receptor	1	1	4	1.00	3.14	0.71	1.04
Complement C1q tumor necrosis factor_related protein 8	1	1	2	1.00	3.01	0.69	0.85
Complement C1q_like protein 3	1	1	1	1.00	2.66	0.59	0.83
Plasma protease C1 inhibitor	1	1	1	1.00	2.32	0.72	0.83
Keratin_type II cytoskeletal 1	2	2	6	1.00	0.80	0.20	0.50
Collagen alpha_1(II) chain	1	1	1	1.00	2.11	0.92	1.03
Collagen alpha_1(V) chain	1	1	1	1.00	3.26	0.82	1.16
Collagen alpha_1(VII) chain	1	1	2	1.00	2.69	0.79	0.97
Collagen alpha_1(VIII) chain	1	1	1	1.00	3.37	0.83	1.06
Collagen alpha_1(XII) chain	2	1	13	1.00	2.51	0.86	1.14
Collagen alpha_1(XIV) chain	2	2	3	1.00	2.69	0.88	0.98
Collagen alpha_1(XVI) chain	1	1	1	1.00	3.06	0.78	0.93
Collagen alpha_1(XVII) chain	1	1	1	1.00	3.11	0.94	1.26
Collagen alpha_1(XVIII) chain	2	2	3	1.00	2.90	0.83	1.12
Collagen alpha_1(XX) chain	1	1	3	1.00	2.62	0.85	0.99
Collagen alpha_1(XXI) chain	1	1	1	1.00	2.55	0.61	0.90
Collagen alpha_1(XXVIII) chain	1	1	4	1.00	2.86	0.73	0.77
Collagen alpha_2(I) chain	1	1	1	1.00	2.24	0.80	0.97
Collagen alpha_2(X) chain	1	1	2	1.00	2.09	0.74	0.72
Collagen alpha_2(VI) chain	1	1	1	1.00	3.09	0.71	1.01
Collagen alpha_3(VI) chain	2	2	4	1.00	2.64	0.82	1.21
Collagen alpha_4(IV) chain	1	1	4	1.00	3.05	0.91	1.01
Collagen alpha_5(VI) chain	1	1	2	1.00	2.69	0.71	0.80
Collagen alpha_6(VI) chain	1	1	1	1.00	2.69	0.71	0.80
von Willebrand factor	1	1	1	1.00	3.38	0.79	0.87
von Willebrand factor A domain_containing protein 8	2	2	7	1.00	2.39	0.66	0.98
von Willebrand factor A domain_containing protein 5A	1	1	1	1.00	11.30	1.56	2.28
von Willebrand factor D and EGF domain_containing protein	1	1	3	1.00	2.06	0.79	1.13
von Willebrand factor C domain_containing protein 2_like	1	1	1	1.00	2.70	0.72	0.94
Coagulation factor V	2	2	2	1.00	3.36	0.70	1.13
Coagulation factor VII	1	1	6	1.00	3.97	0.69	1.09
Inter_alpha_trypsin inhibitor heavy chain H4	1	2	18	1.00	4.58	0.82	1.09
Fibrinogen silencer_binding protein	1	1	14	1.00	2.49	0.73	0.95
Protein Z_dependent protease inhibitor	2	1	2	1.00	5.61	1.38	2.31
Plasminogen	1	1	1	1.00	3.01	0.91	0.95
Plasminogen_like protein B	1	1	2	1.00	6.14	1.01	1.17
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA_binding protein	9	14	122	1.00	4.47	0.77	1.05
Platelet endothelial cell adhesion molecule	6	6	14	1.00	3.00	0.88	1.02
Platelet activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	1	1	2	1.00	2.87	0.64	0.73
Platelet activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	2	3	9	1.00	3.28	0.68	1.27
Platelet_derived growth factor receptor beta	1	1	2	1.00	2.85	0.86	1.06
Platelet_derived growth factor subunit A	1	1	2	1.00	2.62	0.74	0.97
High mobility group protein B1	7	15	85	1.00	2.70	0.78	1.02
High mobility group protein B2	8	14	106	1.00	2.97	0.83	1.03
High mobility group protein B3	4	5	37	1.00	2.79	0.71	1.00
Histone H2A type 1_D	1	3	41	1.00	4.01	0.75	1.08
Histone H2A type 3	5	14	154	1.00	3.63	0.78	1.07
Histone H2A.J	1	2	14	1.00	3.57	0.74	1.06
Histone H2B type 3_B	4	8	69	1.00	3.54	0.80	1.10
Histone H2A type 2_B	1	1	14	1.00	3.35	0.83	1.05

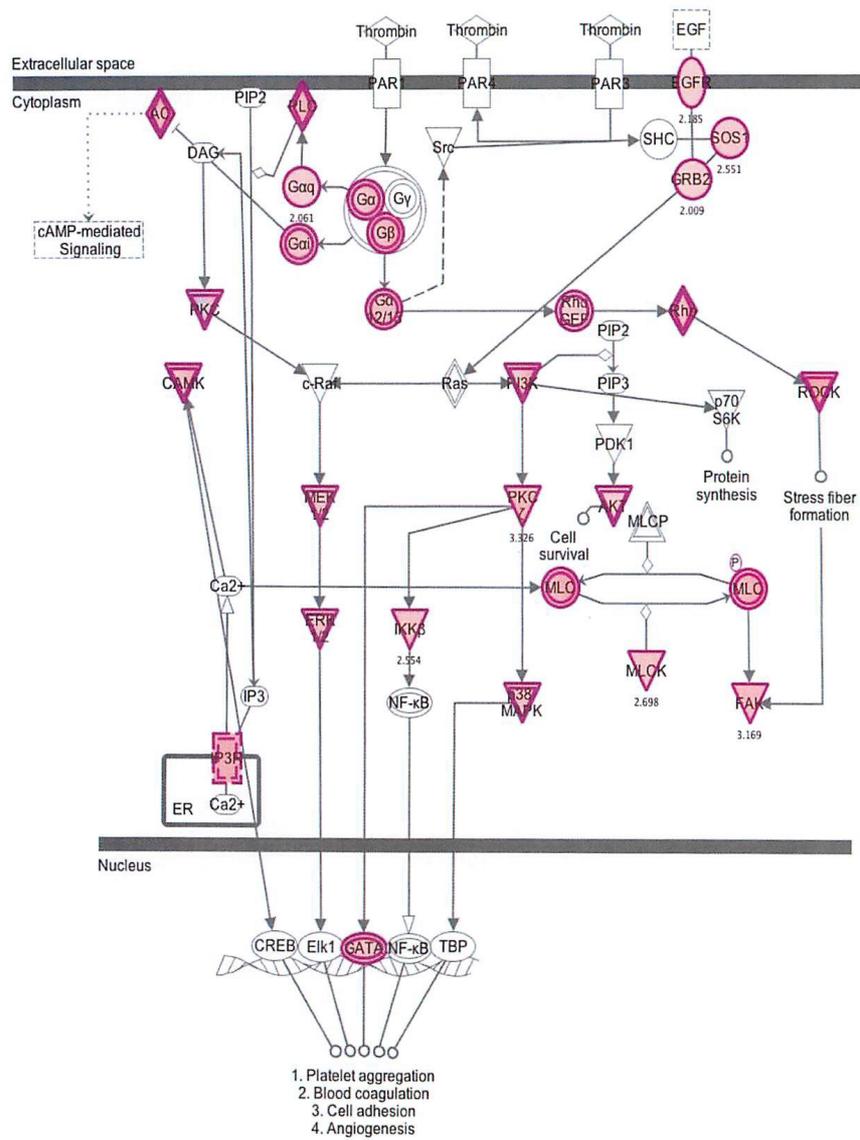


図2. PC上で培養したTHP-1における
 トロンビンシグナル関連タンパク質の発現挙動

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
遺伝子発現の網羅的解析を利用した
医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験

研究分担者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
研究協力者 河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

研究要旨

本研究では、医用材料として生体親和性高分子材料であるポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)とポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)の2種類のポリマーに着目し、細胞としてはヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)及びヒト単球(Human acute monocytic leukemia cell line; THP-1)に着目して、組成比の異なるPMEA/PHEMAコポリマーのコーティング処理した表面上でhMSCまたはTHP-1を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。

hMSCへの生体親和性高分子材料の影響について検討したところ、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition(EMT; 上皮間葉転換)Pathwayに関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。さらに、TGF- β , FGF Receptor やEGF Receptorを介した経路の誘導によるEMT Pathwayの亢進は全てのコーティング処理で認められたが、Notch誘導によるEMT Pathwayの亢進は、PMEAのみ顕著にみられた。このことから、PMEAの割合が高い方がEMT Pathwayが亢進され易い可能性が示唆された。

THP-1への生体親和性高分子材料コーティング処理による遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEAでは有意に上昇する機能が多く見られ、反対にPHEMAでは有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー(M75H25, M50H50, M25H75)は有意に影響を受ける機能は少なかった。生体親和性高分子材料による影響の大きさはPMEA > PHEMA > コポリマー(M25H75 > M75H25, M50H50)の順であった。このことから、コポリマーの方が、それぞれのポリマーのみよりも細胞が影響を受けにくい材料である可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では、医用材料と細胞との相互作用について、細胞側からの検討を目的として生化学的・生物学的試験を行っている。我々はまず骨親和性評価を目的として、医用材料として純チタン (Ti)、細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) に着目した。Ti 及び Ti 合金は、耐食性、低アレルギー性などの優れた生体適合性を持つ事が知られ、さらに骨と直接結合するという性質を有しており、人工骨や歯根などの医用材料として広く利用されている。一方、hMSC は、多分化能と自己複製能を持ち幅広い再生医療分野での臨床研究の場ですでに利用されている。また、その採取技術及び *in vitro* での培養技術も確立されていることから、間葉系幹細胞は細胞・組織加工医療機器の材料として現段階で最も実用に近いものの一つであると考えられる。我々は昨年度まで、骨再生医療製品等を想定した検討として、純 Ti 表面の化学処理が hMSC の骨分化へ及ぼす影響について検討してきた。その結果、Ti 表面へのカルシウム導入処理により hMSC の骨分化が誘導されることを見出し、さらに hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH1H の誘導によって引き起こされ、Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系の関与や Wnt / - カテニンシグナル伝達経路の活性化の寄与なども見出した¹⁾。

今年度は、血液適合性評価を目的として、医用材料としてポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)とポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)の2種類のポリマーに着目した。どちらも血液適合性に優れている

材料であり、様々な医療製品のコーティングに利用されている。しかしながらその両者ではそれぞれの表面における中間水の存在の有無の違い等が指摘されており、両者の血液適合性発現のメカニズムは異なると考えられている。

そこで本研究では、両者の組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理がその表面上で培養した細胞へ与える影響について検討を行う事にした。細胞としては、hMSC に加え、血液適合性評価を行うために血球系の細胞であるヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line ; THP-1) に着目し、これら2種類の細胞を用いてそれぞれの細胞の遺伝子発現の網羅的解析を行った。

B. 研究方法

1. 細胞培養

1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 : hMSCs (Lonza) は、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium(MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (MSCGM) で培養した。

2) ヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line) : THP-1 (医薬基盤研究所) は、RPMI に 10% FBS と 0.05mM のメルカプトエタノールを加えた培地で培養した。

2. 基材 (生体親和性高分子コーティング用シート)

1) pre-coated ポリエステルシート (ダイアホイル) (三菱樹脂株) で厚さ 0.075mm、直径 35mm のものを用いた。

2) ポリカーボネートシート (菅原工芸) で厚さ 0.1mm、直径 33mm のものを用いた。

3. 基材への生体親和性高分子のコーティング処理

1) コポリマー溶液の調製

PMEA:PHEMA = 100:0 (PMEA), 75:25 (M75H25), 50:50 (M50H50), 25:75 (M25H75), 0:100 (PHEMA) の 5 種類を 1 w/v% (メタノール) に調製した。

2) ポリエステルシートへのコポリマーコーティング処理

シートをメタノールで洗浄した後、それぞれの組成のコポリマー溶液を 125 μ L 滴下し、[1] 500rpm で 5 秒間、[2] 2000rpm で 10 秒間、[3] 4000rpm で 5 秒間の 3 段階でスピンコートした。乾燥後、もう一度同条件でスピンコートし、一晩乾燥した。

3) ポリカーボネートシートへのコポリマーコーティング処理

シートをメタノールで洗浄した後、それぞれの組成のコポリマー溶液を 100 μ L 滴下し、4000rpm で 10 秒間スピンコートした。乾燥後、もう一度同条件でスピンコートし、一晩乾燥した。

4. 表面処理をした医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験

1) hMSC

6 ウェルプレート (Corning) に 5 種類のコポリマーコーティングを施したポリエステルシートまたはコーティングしていないポリエステルシートを入れて、それぞれに hMSC を播種し、MSCBM に MCGS を加えた培地 (MSCGM) で 24 時間培養した。

2) THP-1

6 ウェルプレート (Corning) に 5 種類のコポリマーコーティングを施したポリカーボネートシートまたはコーティング

していないポリカーボネートシートを入れて、それぞれに THP-1 を播種し、RPMI に 10% FBS と 0.05mM のメルカプトエタノールを加えた培地で 24 時間培養した。

3) Total RNA の調製

それぞれの生体親和性高分子をコーティングしたシート上で 24 時間培養した hMSC または THP-1 から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。

4) DNA マイクロアレイ解析

それぞれの total RNA を用いて、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。さらに、得られたマイクロアレイデータから GeneSpring GX 12.5 (Agilent Technologies) を用いて統計学的、生物学的解析を行った。

5) パスウェイ解析

DNA アレイ解析による mRNA 発現の網羅的解析の結果から、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてパスウェイ解析を行った。

5. 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞及びヒト単球は市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

C. 研究結果

1. 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 (hMSC) の機能への影響について

まず、それぞれ組成比の異なる PMEA/PHEMA コポリマーでコーティング処理された材料上で hMSC を培養した際の細胞の形態について検討した。hMSC の 24 時間培養後の形態は、PET 及び PMEA、

M75H25、M50H50、M25H75 でコーティングされた材料上では、hMSC が接着していたが、PHEMA でコーティング処理された材料には細胞が接着せず、浮遊の状態が存在している様子が認められた（図1）。

次に、hMSC が接着した材料（PMEA/PHEMA コポリマー4種類とPET）上で培養した hMSC における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。PET と比較し、生体親和性高分子材料によって発現が2倍以上上昇または誘導された遺伝子群について解析したところ、PMEA、M75H25、M50H50 の材料によって、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition（EMT；上皮間葉転換）Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった（表1）。

EMT は、TGF β 、Notch、Wnt、Receptor tyrosine kinases によって誘導される（図2）ため、次にそれぞれのシグナル伝達について生体親和性高分子のコーティング処理による変化について検討した。TGF β が誘導するシグナル伝達経路については、PMEA、M75H25、M50H50、M25H75 のどの材料についても EMT への経路で有意に上昇または誘導される遺伝子が多く観察され、EMT が亢進される事がわかった（図3-1~4）。Notch が誘導するシグナル伝達経路については、PMEA でのみ EMT への経路における遺伝子の発現上昇及び誘導が見られ、M75H25、M50H50、M25H75 ではその傾向は認められなかった（図4-1~4）。Wnt が誘導するシグナル伝達経路については、EMT への経路における遺伝子の発現には有意な変化は認められなかった

（図5-1~4）。Receptor tyrosine kinases が誘導するシグナル伝達経路については、PMEA、M75H25、M50H50、M25H75 のどの材料についても EMT への FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路で有意に上昇または誘導される遺伝子が多く観察され、EMT が亢進される事がわかった（図6-1~4）。

2. 生体親和性高分子材料によるヒト単球（THP-1）の機能への影響について

それぞれ組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーでコーティング処理された材料上で THP-1 を培養した際の THP-1 における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。

まず、各生体親和性高分子材料が THP-1 に与える影響について、THP-1 の遺伝子発現パターンによる階層的クラスタリングを行った。dish と最も類似したパターンを示したのが、M75H25 及び M50H50、次いで M25H75、PHEMA の順で、PMEA が最も違うパターンを示した（図7）。次に、dish と比較して生体親和性高分子材料によって発現が2倍以上上昇または1/2以下に低下した遺伝子群の発現変化が、疾病及び生体に関わる機能に及ぼす影響について検討した。全体的な変化について、図8に示す。PMEA により有意に上昇すると予想される機能が多く認められ、反対に PHEMA により有意に低下すると予想される機能が多く認められた。一方、M75H25、M50H50、M25H75 のコポリマーによる影響はあまり認められなかった。

それぞれのコーティング処理による影響についてまとめてみた。PMEA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾

病及び生体関連機能について表 2 に示した。上昇すると予想される機能は 42 種類もあり、PMEA による影響の大きさが伺われた。一方、有意に低下すると予想される疾病及び生体関連機能は、4 種類であった(表 3)。M75H25 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、2 種類であり(表 4)、低下すると予想される機能は 4 種類であった(表 5)。M50H50 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、3 種類であり(表 6)、低下すると予想される機能は 1 種類だけであった(表 7)。M25H75 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、3 種類であり(表 8)、低下すると予想される機能は 2 種類であった(表 9)。PHEMA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は 11 種類であり比較的多かった(表 10)。また、有意に低下すると予想される疾病及び生体関連機能は、73 種類もあり(表 11) PMEA による影響の大きさが伺われた。

次に、コーティング処理による THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に変化すると予想される毒性関連機能について検討した。PHEMA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される毒性関連機能は 6 種類あり、逆に低下すると予想される機能は 2 種類であった(表 12)。その他の生体親和性高分子材料上で培養した THP-1 については、有意に変化が予想

される毒性関連機能は認められなかった。

D. 考察

PMEA は、細胞が異物と認識しにくい高分子ポリマーとして開発され、その優れた生体適合性から人工肺などの様々な医療機器のコーティングに利用されている。生体適合性の高さには高分子が含む中間水の量との関連性が指摘されている。PMEA におけるこの中間水の存在が血液適合性発現に大きく寄与していると考えられている²⁾。一方、PHEMA は中間水の存在が認められない²⁾。また PHEMA は、細胞の接着を防ぐためのコーティング剤としても利用されている。この両者について組成比を変えて共重合させた材料は、それぞれ中間水の含有率も異なり表面特性も変化する事から、細胞との相互作用にも異なる影響を及ぼすと想定される。そこで本研究では、組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理した表面上でヒト細胞(hMSC または THP-1)を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討を行った。

まず、生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について検討した。播種 24 時間後において、やはり PHEMA100%のコーティング処理したシート上では、hMSC が接着せず、浮遊の状態が存在していた(図 1)。しかし、PMEA が 25%以上含まれたコーティング処理のもの(PMEA, M75H25, M50H50, M25H75)では、hMSC は接着していた。この様に、コーティングしたポリマーの組成比を変える事で、hMSC の形態等に変化が見られることが分かっ

た。次に、hMSC が接着した材料(PMEA / PHEMA コポリマー4 種類と PET)上で培養した hMSC における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。その結果、PET と比較し、生体親和性高分子材料によって発現が 2 倍以上上昇または誘導された遺伝子群について解析したところ、PMEA, M75H25, M50H50 の材料によって、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT ; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった(表 1)。EMT は、TGF- β , Notch, Wnt, Receptor tyrosine kinases によって誘導される(図 2)ため、それぞれのシグナル伝達についてコーティング処理による変化について検討したところ、TGF- β 及び FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められた(図 3, 6)。一方、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著にみられた(図 4)。このことから、PMEA の割合が高い方が EMT Pathway が亢進され易い可能性が示唆された。

EMT は近年、がん細胞の分化度の制御調節機構の一つとして着目されており、EMT の誘導により細胞の運動性の亢進や細胞外基質の蓄積、細胞老化の抑制、幹細胞様機能(未分化性など)の獲得などが示されている。以上より、生体親和性高分子上で培養した hMSC の遺伝子発現プロファイルの変化から、PMEA / PHEMA コポリマーコーティング材料が hMSC の運動性の亢進や未分化性の維持などへ影響を与える可能性が示唆された。

次に、組成比の異なる PMEA / PHEMA

コポリマーのコーティング処理した表面上で THP-1 を培養し、細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。各生体親和性高分子材料の THP-1 に与える影響について、THP-1 の遺伝子発現パターンによる階層的クラスタリングを行ったところ、dish と最も類似したパターンを示したのが、M75H25, M50H50、次いで M25H75、PHEMA、PMEA の順であった(図 7)。また、dish と比較して生体親和性高分子材料によって発現が有意に変化(2 倍以上上昇または 1/2 以下に低下)した遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ(図 8 表 3 ~ 11)、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に PHEMA では有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー(M75H25, M50H50, M25H75)は有意に影響を受ける機能は少なかった。この様に、生体親和性高分子材料によるコーティング処理は THP-1 の遺伝子発現に影響を与え、その大きさは PMEA > PHEMA > コポリマー(M25H75 > M75H25, M50H50)の順であった。このことから、コポリマー(両高分子ポリマーの共重合体)の方が、それぞれの高分子材料のみ(PMEA, PHEMA それぞれ 100%のもの)よりも細胞が影響を受けにくい材料である可能性が示唆された。

E. 結論

医用材料と細胞との相互作用について検討を行っている。本研究では、血液適合性評価を目的として、医用材料として生体親和性高分子材料であるポリ(2-メ

トキシエチルアクリレート)(PMEA)とポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)の2種類のポリマーに着目し、細胞としてはヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)及びヒト単球(Human acute monocytic leukemia cell line; THP-1)に着目して、組成比の異なるPMEA/PHEMAコポリマーのコーティング処理した表面上でhMSCまたはTHP-1を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。

hMSCへの生体親和性高分子材料の影響について検討したところ、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition(EMT;上皮間葉転換)Pathwayに関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。さらに、TGF- β , FGF ReceptorやEGF Receptorを介した経路の誘導によるEMT Pathwayの亢進は全てのコーティング処理で認められたが、Notch誘導によるEMT Pathwayの亢進は、PMEAのみ顕著にみられた。

THP-1への生体親和性高分子材料コーティング処理による遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEAでは有意に上昇する機能が多く見られ、反対にPHEMAでは有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー(M75H25, M50H50, M25H75)は有意に影響を受ける機能は少なかった。生体親和性高分子材料による影響の大きさはPMEA > PHEMA > コポリマー(M25H75 > M75H25, M50H50)の順であった。

参考文献

- 1) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., and Matsuoka A. : Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J. Biomed. Mater. Res. A., 101(9), 2573-85, (2013).
- 2) $^2\text{H-NMR}$ によるポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)およびポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)中に存在する水の状態分析, 三輪優子, 田中賢, 押山広明, 望月明, バイオマテリアル - 生体材料, 21 (2003) 143-148.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kono K., Niimi S., and Sawada R. : Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. J. Bone Marrow Res., in press
- 2) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., and Matsuoka A. : Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J. Biomed. Mater. Res. A., 101(9), 2573-85, (2013).
- 3) Ito-Nagahata T., Kurihara C., Hasebe M., Ishii A., Yamashita K., Iwabuchi M., Sonoda M., Fukuhara K., Sawada R., Matsuoka A., Fujiwara Y. : Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK. Biosci. Biotechnol. Biochem., 77(6), 1229-1235, (2013).

4) Sato Y., Tsutsumi H., Sawada R., Suzuki T., Yasuda S. : Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products. Bull. Natl. Inst. Health. Sci., 131, 16-19, (2013).

2. 学会発表

1) 澤田留美「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立を目指して」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)

2) 松岡 厚子, 澤田 留美, 加藤 玲子, 河野 健「次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野審査 WG 活動報告」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)

3) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., Matsuoka A.; The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

4) Kono K., Sawada R., Matsuoka A.; Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

5) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Kuroda T., Sawada R., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.; Validation of in vivo tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

6) 澤田留美, 河野 健, 加藤玲子, 新見伸

吾「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響(1): 遺伝子発現の網羅的解析」第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

7) 加藤玲子, 齋島由二, 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 (2013.11)

8) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 36 回日本分子生物学会年会 (2013.12)

9) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Matsuyama A., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.; Characterization of in vivo tumorigenicity test using severe immunodeficient NOG mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products, World Stem Cell Summit 2013 (2013.12)

10) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細胞の増殖培養過程における品質評価のための遺伝子発現解析」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

11) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

12) 齋島由二, 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 (2014.3)

13) 佐々木寛人, 蟹江慧, 澤田留美, 清田 泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞

胞の継代培養における品質劣化の細胞形態
と発現プロファイリングとの相関解析」第
13 回日本再生医療学会総会（2014.3）
14) 佐々木寛人，高橋厚妃，蟹江慧，竹内
一郎，澤田留美，清田泰次郎，本多裕之，
加藤竜司「細胞画像情報解析による間葉系
幹細胞分化能の品質プロファイリング」第
13 回日本再生医療学会総会（2014.3）

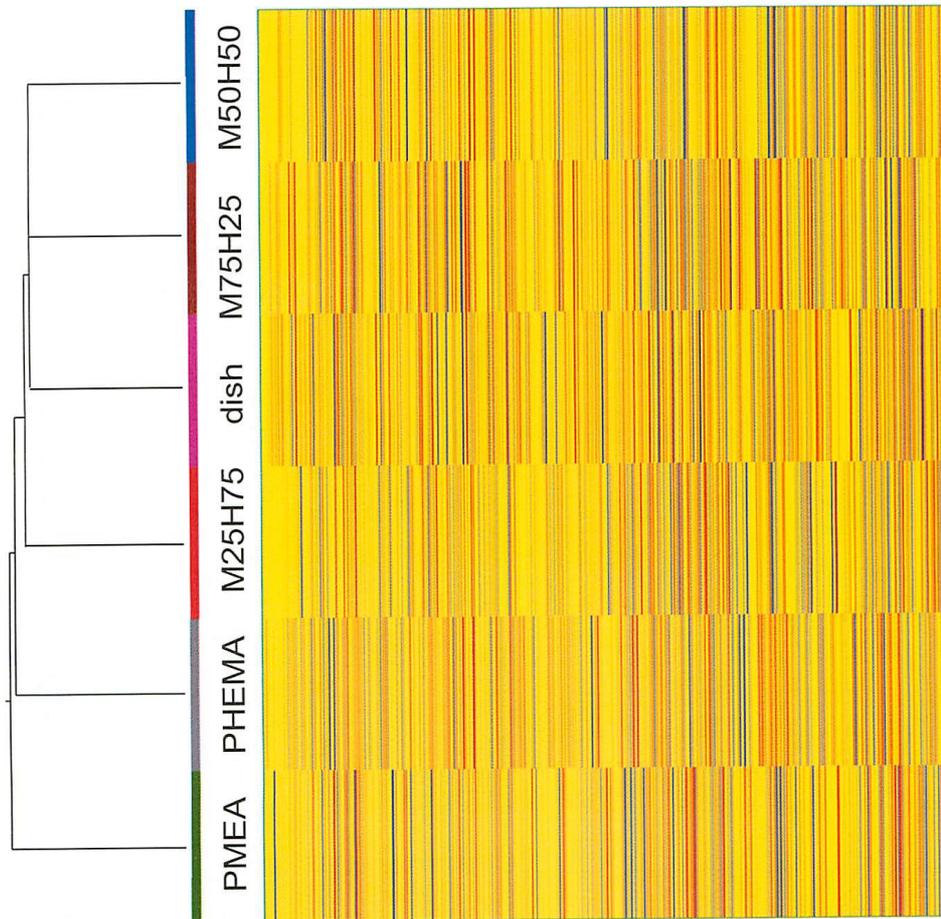
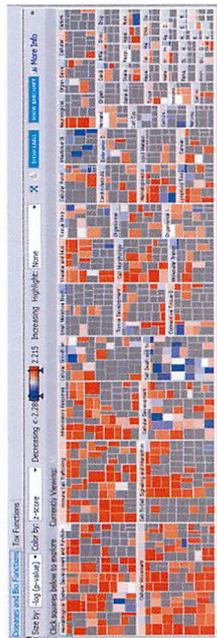
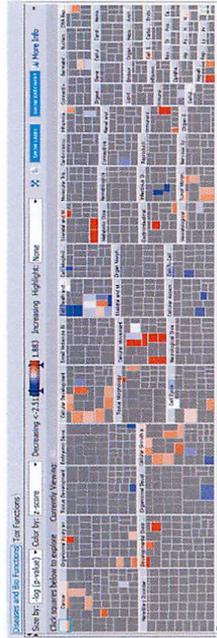


図7. 階層的クラスタリングを用いたTHP-1の遺伝子発現パターンによる各生体親和性高分子材料の分類

PMEA



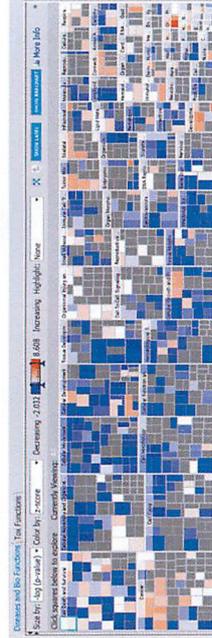
M25H75



M75H25



PHEMA



M50H50



Diseases and Bio Functions

■ 上昇 ■ 低下

図8. 生体親和性高分子材料によって発現が2倍以上上昇または1/2以下に低下した遺伝子群の発現変化が疾病及び生体関連機能に及ぼす影響

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	藪島由二	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、分子動力的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
- Comformers: 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 $1.22\text{g}/\text{cm}^3$ に対して、1 辺 23.06 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 ほど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 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ことができる。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 4 以下、4-5、5-6、6-7、7-8 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が必要である。より多くの試行数で傾向を見ていく必要があると思うが、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 1 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 (t_s 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、分子動学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

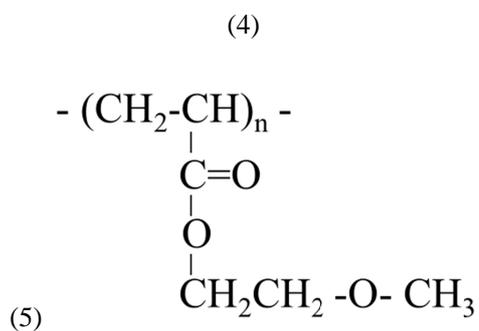
- (1) 植松美幸, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 平成 22 年度 総括・分担研究報告書 95-103 2011 年
- (2) 植松美幸, 薮島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也: 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討, 材料/細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究 平成 23 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

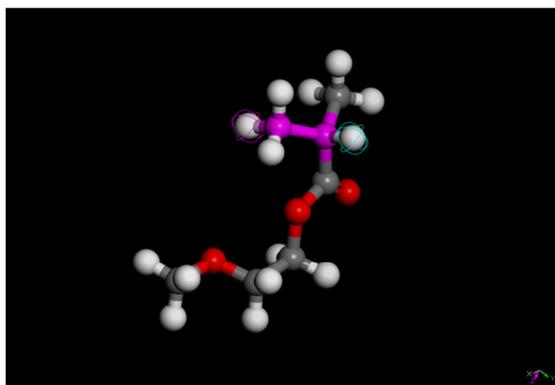
- (4) Jhon, M. S.; Andrade, J. D. J. Biomed. Mater. Res. 7, 509 (1973).
- (5) M. Tanaka et al. Polym. Int. 49, 1709 (2000).
- (6) S. Morita, M. Tanaka, Y. Ozaki, Langmuir, 23, 3750 (2007).
- (7) G. F. Li et al., J. Am. Chem. Soc., 126, 12198(2004).
- (8) Y. Miwa et al., Polymer, 50, 6091(2009).

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, 薮島由二, 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, 薮島由二, 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学的解析 (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

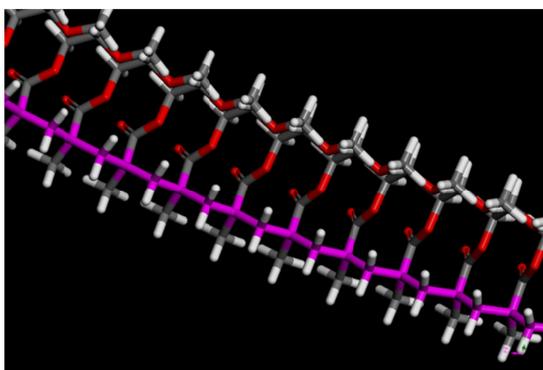


(a) 分子構造式

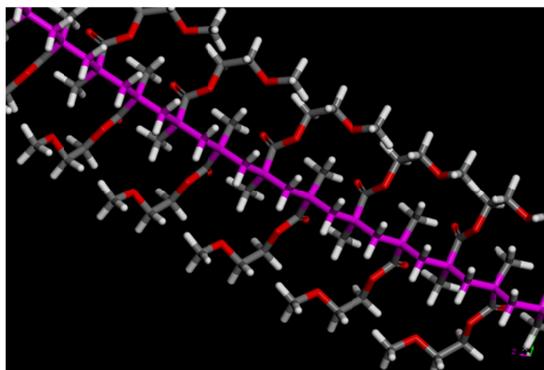


(b) エネルギー最小となる構造
(Conformer を用いた結果)

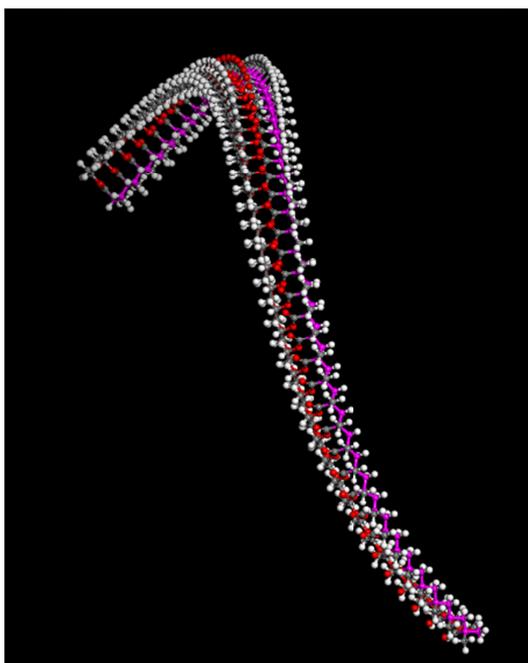
図 1 MEA (モノメトリックな構造)



(a) 拡大図

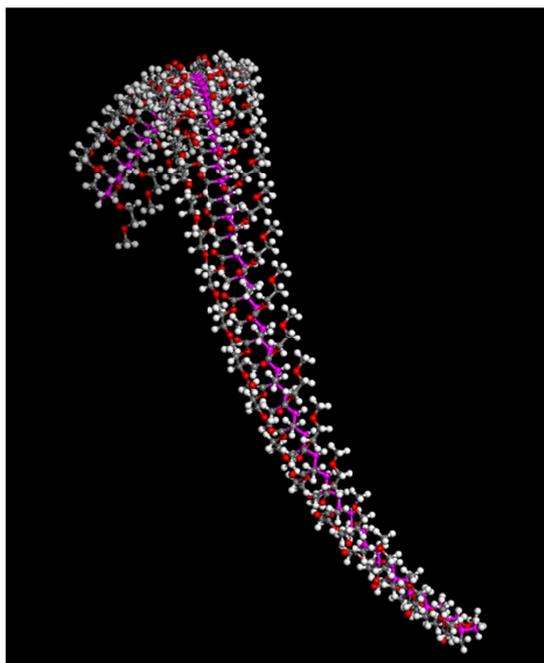


(a) 拡大図



(b) 全体図

図 2 PME A (50 量体) isotactic



(b) 全体図

図 3 PME A (50 量体) syndiotactic

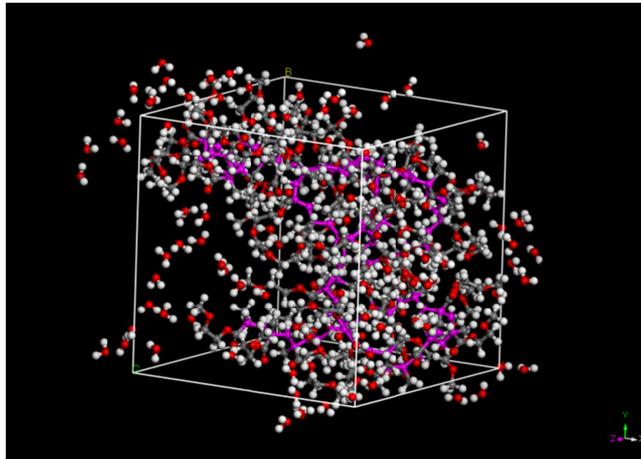


図 4 Cell 内に配置した PME (50 量体) 1 分子と水 100 分子
 (Amorphous Cell による構造の作成結果)

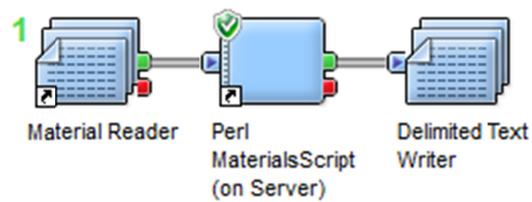


図 5 メトキシ基の酸素原子周りの水の個数の算出
 (Pipeline Pilot によるプロトコル)

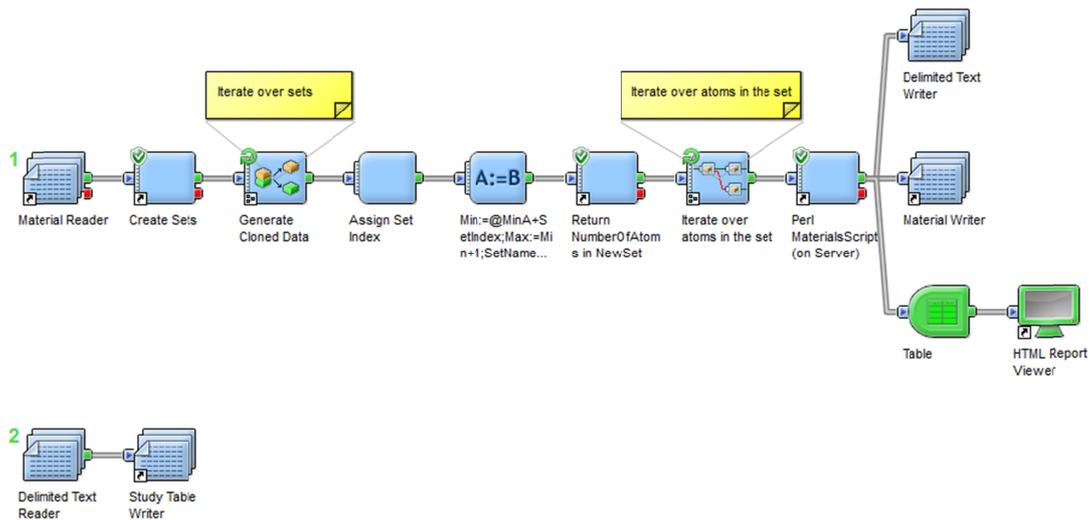
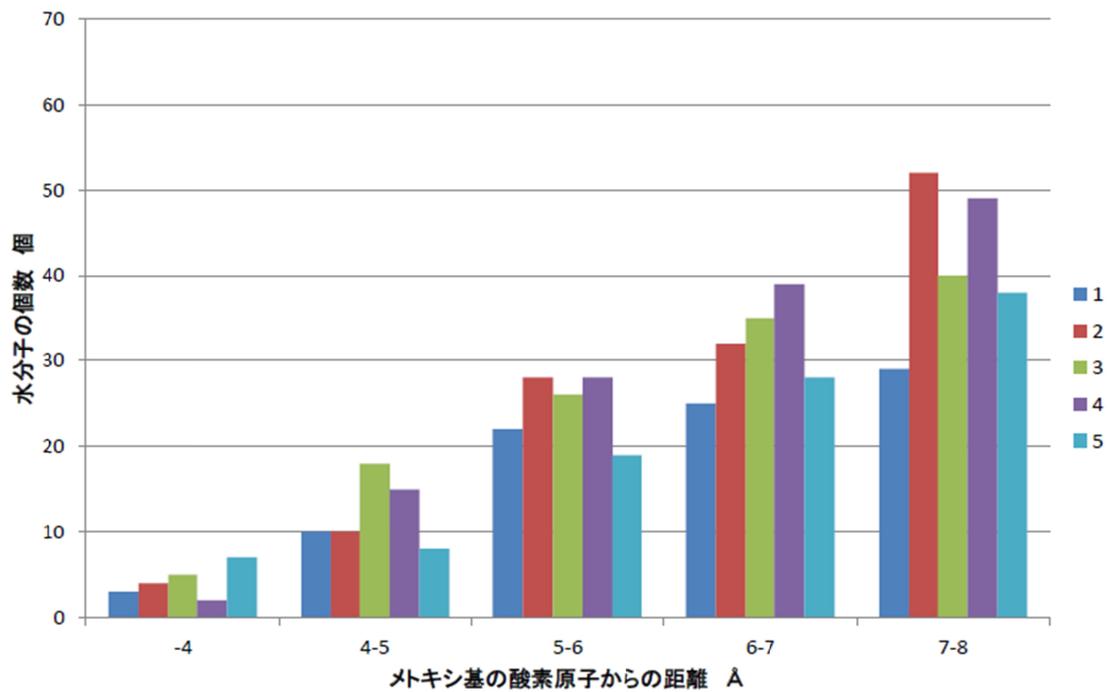
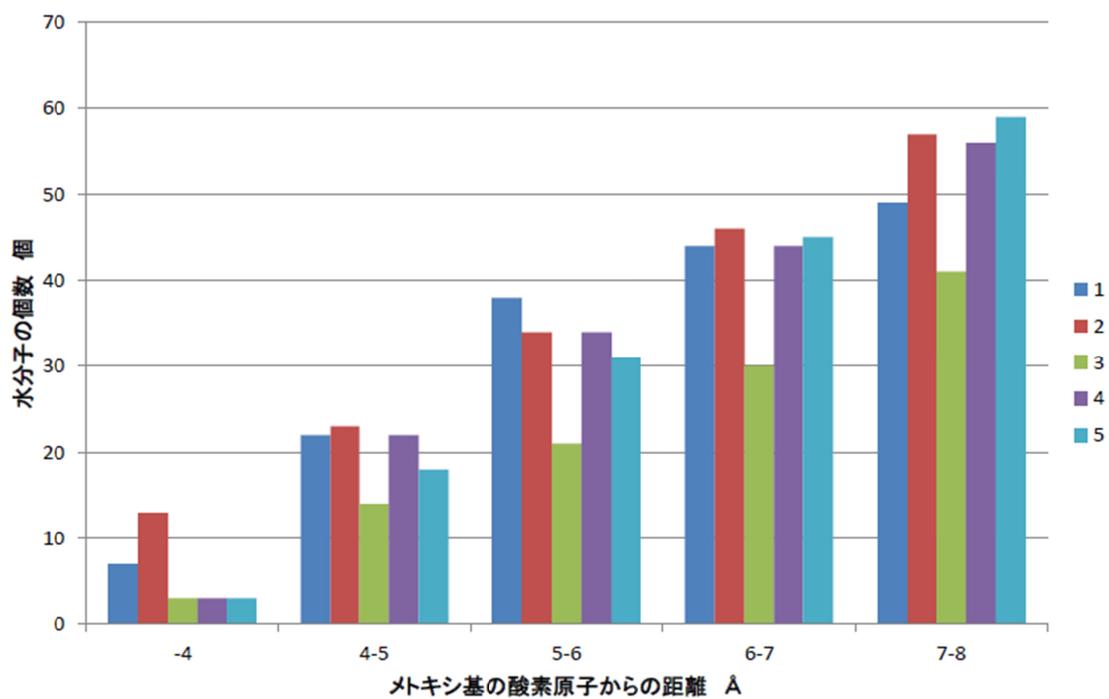


図 6 メトキシ基の酸素原子に対する水分子の相対速度の算出
 (Pipeline Pilot によるプロトコル)

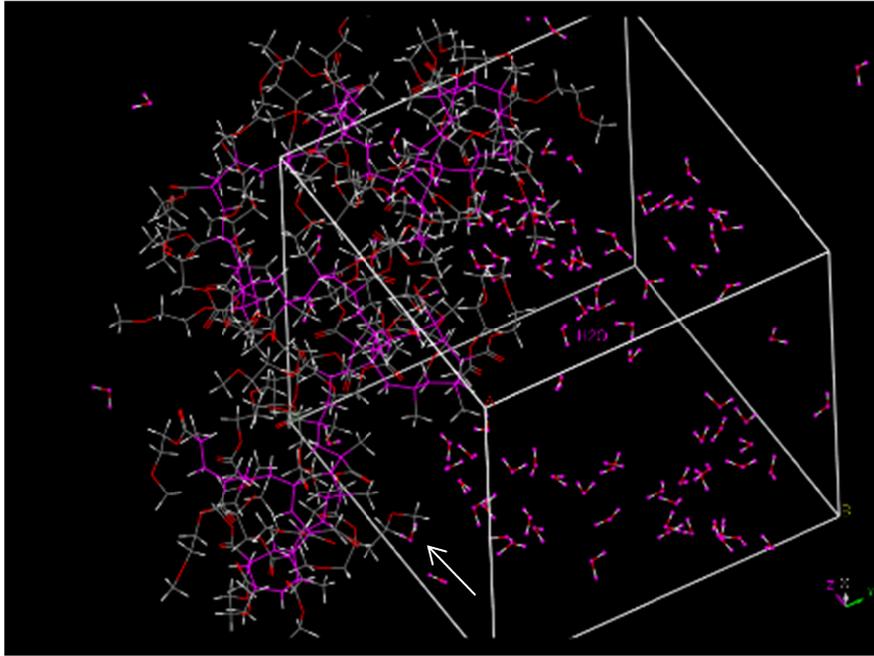


(a) isotactic の結果

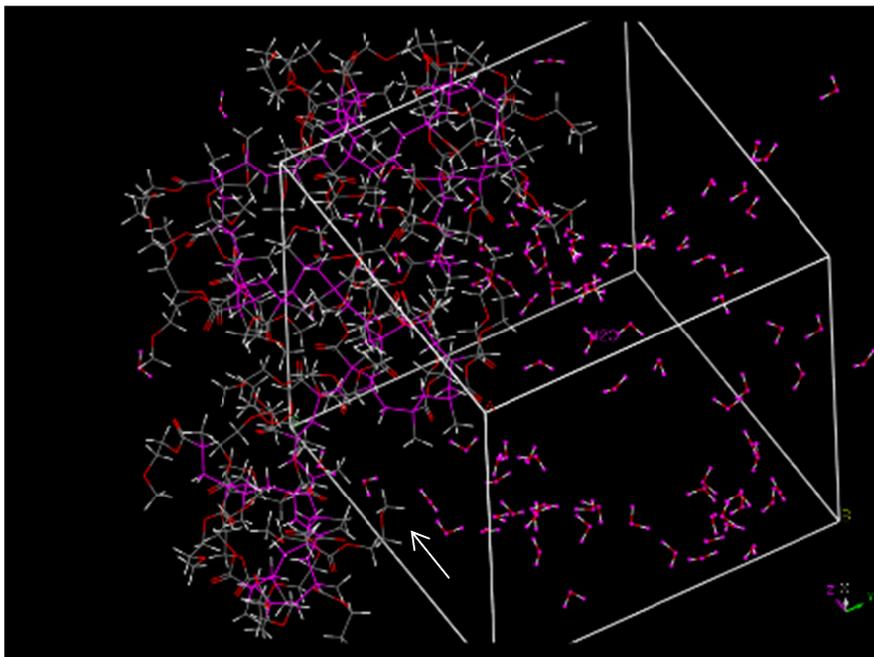


(b) syndiotactic の結果

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 PMEА (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学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)（HEMA）、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）。HEMA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）をスピコートに設置し、被験ポリマーの1w/v%メタノール溶液20 μ L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、HEMAでは29 μ g/cm²、PMEAでは3.2 μ g/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 QN μ （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 μ Lを加え、セル温度及び攪拌速度をそれぞれ37 $^{\circ}$ 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 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 PMEA 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 PMEA が低く、ランダム共重合体においては MEA 比率の増加に伴って低下する傾向が認められた。また、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、PMEA 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 PMEA 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 PMEA 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、PMEA 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 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 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 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学的に解析した。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 PMEA 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学的に解析するため、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) 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）

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）

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）

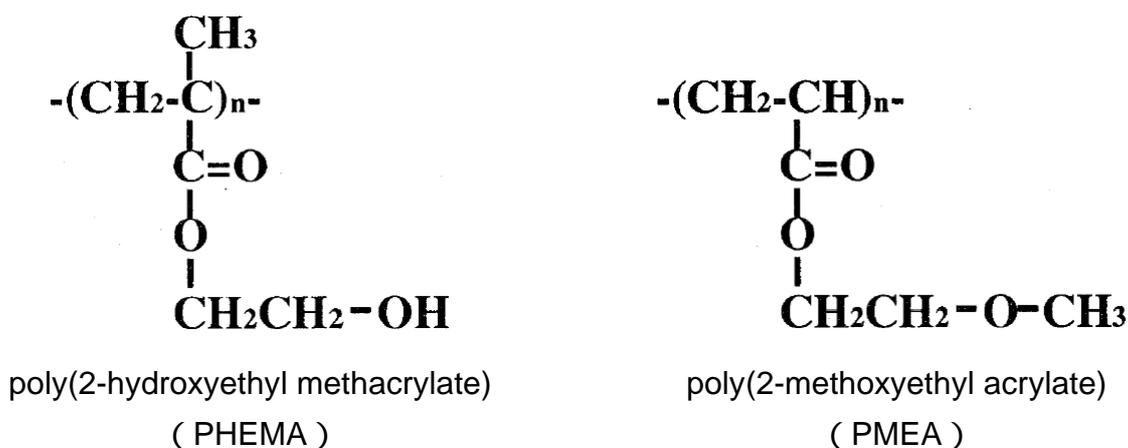


図 1 PHEMA 及び PMEA の化学構造

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

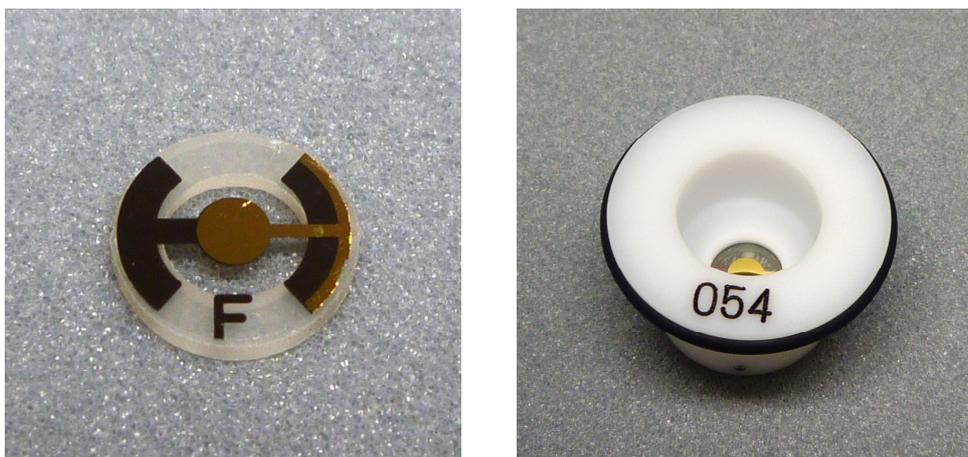


図 2 金電極付き水晶板（左）及び QCM センサーセル（右）



図 3 QCM 装置の外観（左）及び測定部（左）

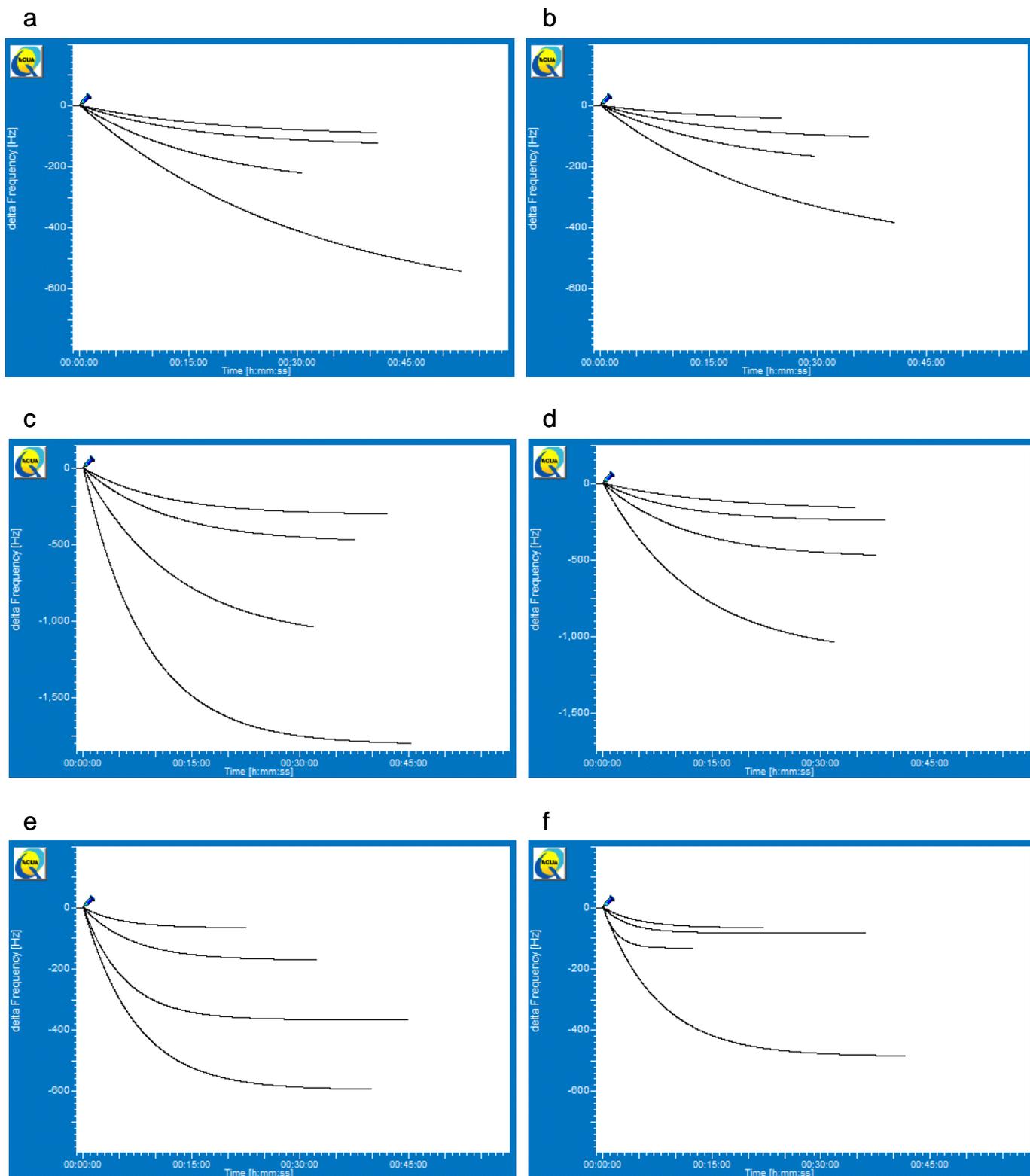


図4 PHEMA表面(a, c, e)及びPMEA表面(b, d, f)に吸着するアルブミン(a, b)、
 フィブリノーゲン(c, d)及びフィブロネクチン(e, f)のQCMセンサーグラム

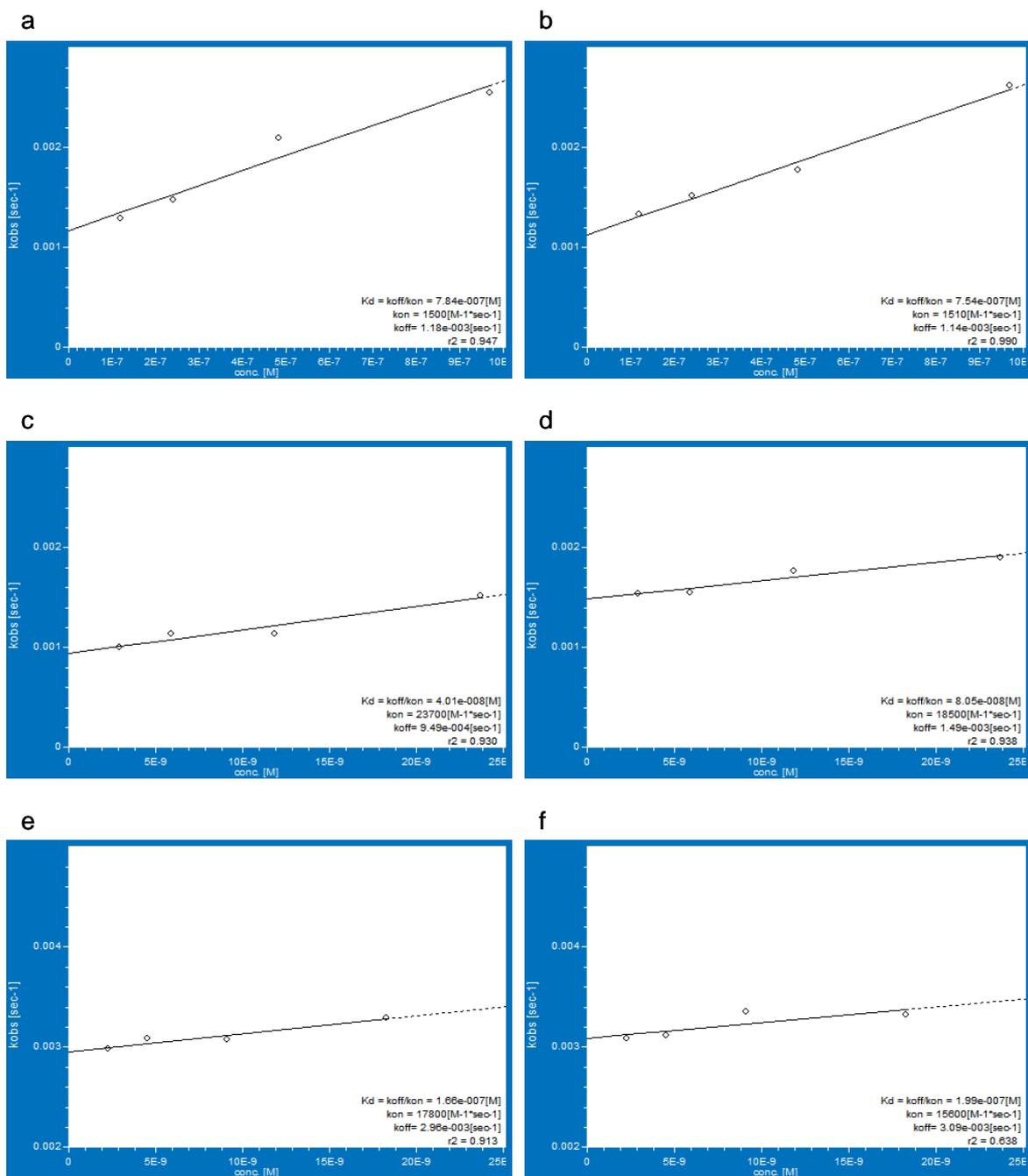


図5 PHEMA表面 (a, c, e) 及びPMEA表面 (b, d, f) に吸着するアルブミン (a, b),
 フィブリノーゲン (c, d) 及びフィブロネクチン (e, f) の速度論的解析結果

表2 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

表3 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

表4 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

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は、静電相互作用、水素結合さらに疎水性相互作用など種々の分子間相互作用が影響を与える。同時に、これらの相互作用は水を媒体として作用する力である。これらのことから、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の両者が強く関与すると考えられる。そこで本研究では、表面特異的な水和構造および表面で働く分子間相互作用が、材料表面とタンパク質との間に働く相互作用に与える影響を定量的に解析することを目的とする。本年度は、原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定を用いることで、タンパク質吸着挙動を分子間相互作用の観点から解析した。構造が明確であると同時に、広範囲にわたる界面科学的特性を有する表面を、種々のモノマーユニットからなる高密度ポリマーブラシ構造を用いて構築した。作製したモデル表面に対するタンパク質および官能基の直接的な相互作用は、ポリマーブラシ表面により大きく異なったが、タンパク質とほとんど相互作用しない双性イオン型ポリマーブラシ表面では、タンパク質に存在している官能基との相互作用がほとんど検出されなかった。また、ポリマーブラシ表面近傍で作用する分子間相互作用の種類、大きさ、伝播範囲を解析することにより、双性イオン型ポリマーブラシ表面では、静電的相互作用および疎水性相互作用が働いていないことが明らかとなった。これまでに確立した表面特異的な水和構造および分子間相互作用の解析手法は、タンパク質吸着挙動の理解につながるとともに、タンパク質から認識されない表面設計を提示することを可能とする。

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。このため、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、その起源は明確にされていない。そこで本研究では、材料表面とタンパク質との間に働く分子間相互作用の観点からタンパク質吸着挙動を解析する方法論を確立する。これは、タンパク質が表面と相互作用す

る際の駆動力を明確にできるため、タンパク質吸着現象の動的特性の起源を明らかにできる。具体的には、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、タンパク質を固定化したプローブと材料表面間にナニュートンオーダーで働く相互作用を原子間力顕微鏡(Atomic force microscopy, AFM)のフォースカーブ測定により定量する方法を利用した。

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は、静電相互作用、水素結合さらに疎水性相互作用など種々の分子間相互作用が影響を与える。同時に、これらの相互作用は水を媒体として作用する力である。これらのことから、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の両者が強く関与すると考えられる。そこで本研究では、表面特異的な水和構造および表面で働く分子間相互作用が、材料表面とタンパク質との間に働く相互作用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分子間相互作用は非常に微細であるため、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。そこで本研究では、様々なモノマーユニットを用いて構築したポリマーブラシ構造をモデル表面として利用した。

これまで、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を確立した。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することで、ポリマーブラシ層の化学構造に対応した表面特異的な水和構造を解析してきた。

本年度は、タンパク質や材料表面に存在する官能基同士の相互作用や材料表面で作用する分子間相互作用に着目した。つまり、様々な分子により修飾された AFM プロブを用いてフォースカーブ測定を行うことで、プロブと材料表面間に働く種々の相互作用を定量的に評価するとともに、これらが、タンパク質との相互作用に与える影響について議論した。

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、下記に示すポリマーブラシ層を構築した(図 1)。ポリマーブラシ層を構築する際のモノマー濃度とフリー重合開始剤の比は 100 とした。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)を、カチオン性モノマーとして、trimethylammoniummethyl methacrylate

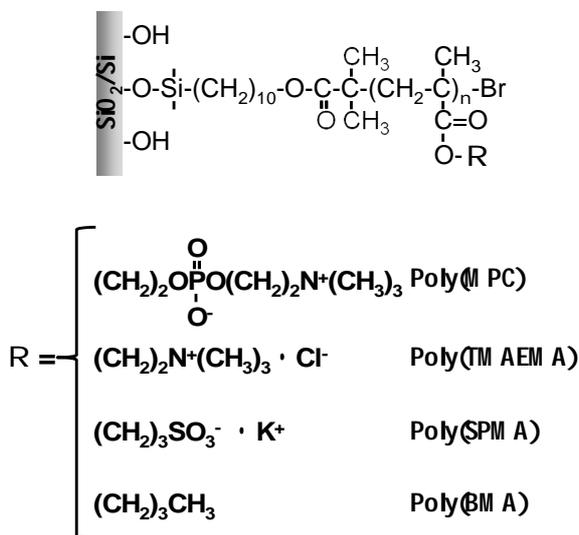


図 1. 作製されたポリマーブラシ層の化学構造。

(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および表面特性を X 線光電子分光(XPS)測定、原子間力顕微鏡(AFM)、分光エリプソメーター、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)により評価した。

2. 二表面間の相互作用測定

図 2 に示すような AFM のフォースカーブ測定により、様々な表面間に働く相互作用を測定した。本研究では、タンパク質、種々の官能基を有する SAM 膜および同化学種のポリマーブラシ層をカンチレバーに固定化した。直接的な相互作用を定量する際には、接近/接触したカンチレバーを表面

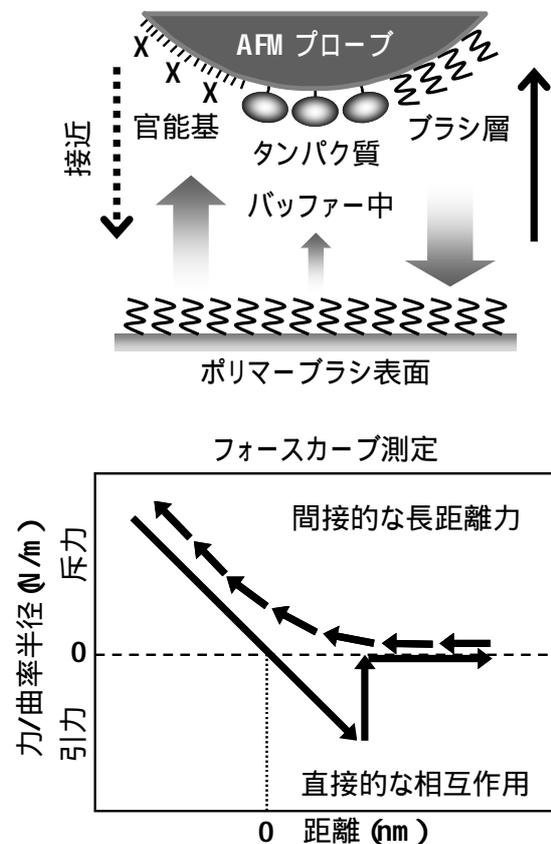


図 2. 原子間力顕微鏡を利用した分子間力相互作用の解析方法。

から引き離す際に引力側へ変位する力を相互作用と定義した。また、間接的に働く遠距離力を評価する際には、カンチレバー表面とポリマーブラシ表面とが接近する際に変位する力を評価した。

タンパク質との直接的な相互作用

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、各ポリマーブラシ表面との間に働く直接的な相互作用を、下記に従い定量した。

金薄膜をスパッタした Si_3N_4 製カンチレバー(曲率半径: 45 nm)を作製し、表面にカルボキシル基末端自己組織化単分子(SAM)膜を形成させた。同カンチレバーを 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide hydrochloride (0.10 mol/L)と *N*-hydroxy succinimide (0.05 mol/L)の水溶液に30分間浸漬した。純水による洗浄後、直ちに各タンパク質のリン酸緩衝液(PBS)に浸漬し、37°Cで1時間静置した(BSA: 1.0 mg/mL, Lys: 0.3 mg/mL)。表面をPBSにより洗浄した後、得られたタンパク質固定化カンチレバーを、室温のPBS中におけるフォースカーブ測定に使用した。各ポリマーブラシ表面に対し、アプローチカーブとリトラクトカーブの最大変位差を100箇所程度測定し、その平均値を直接的な相互作用と定義した。

官能基との直接的な相互作用

プローブレスカンチレバーの先端に直径が20 μm の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SAM膜を形成した。作製したカンチレバーを用いて、室温のPBS中における各ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用を定量した。

ポリマーブラシ層同士の間接的長距離力

前述の直径20 μm のシリカ粒子を用いて、1と同様の手法により、図1に示したポリマーブラシ層を構築し、プローブレスカンチレバー先端にこれを固定した。作製したカンチレバーを用いて、様々な塩濃度の水環境下にて、同種のポリマーブラシ表面間に働く遠距離力を評価した。

(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

作製されたポリマーブラシ表面は、エリブソメトリーから乾燥膜厚が10 nm程度であり、原子間力顕微鏡(AFM)による高さ観察から、乾燥状態で比較的小さい凹凸構造を有し、表面粗さの指標である二乗平均平方根(RMS)値は1.0 nm以下であった。表1より、各ポリマーブラシ表面のグラフト密度はすべて0.10 chains/nm²を超えており、作製されたポリマーブラシ層が高密度領域にあることがわかった。グラフト密度とポリマー鎖の断面積から表面被覆率を概算した結果、グラフト鎖で被覆されていない下地表面は1.0 nm以下のオーダーであり、数ナノメートルのオーダーを有するタンパク質と比べて十分小さかった。つまり、作製されたポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着において、タンパク質の下地表面への直接的な吸着(一次吸着)やグラフトポリマー鎖間への吸着(三次吸着)は回避され、ポリマーブラシ層最表面への吸着が支配的であることが示唆された。

生体応答が誘起される水環境下での表面特性を示す水中の気泡の接触角は、疎水性の側鎖を有するpoly(BMA)ブラシ表面を除いて一様に小さい値となった。また、10 mmol/Lの塩化ナトリウム水溶液における表面電位は、ポリマー自体が有する荷電特性と同様の傾向であった。ただし、poly(BMA)は側鎖に電荷を持たないにも関わらず、負の電荷を有する表面であった。これは疎水性表面に観測される現象であり、表面への電解質イオンの吸着に由来すると考えられる。このように、

表1. ポリマーブラシ表面の特性.

Polymer	Graft density (chains/nm ²)	Water contact angle (deg)		ζ -potential* (mV)
		In air	In water	
Poly(MPC)	0.33	10	9	-5.9
Poly(TMAEMA)	0.45	17	17	64.9
Poly(SPMA)	0.55	11	13	-74.0
Poly(BMA)	0.75	86	73	-37.2

重合度100. * 10 mmol/L NaCl aqueous solution.

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. ポリマーブラシ表面とタンパク質との直接的な相互作用

本研究では、生理条件下でそれぞれ全体として、負および正の正味電荷を有するタンパク質であるBSAおよびLysを用いた。図3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

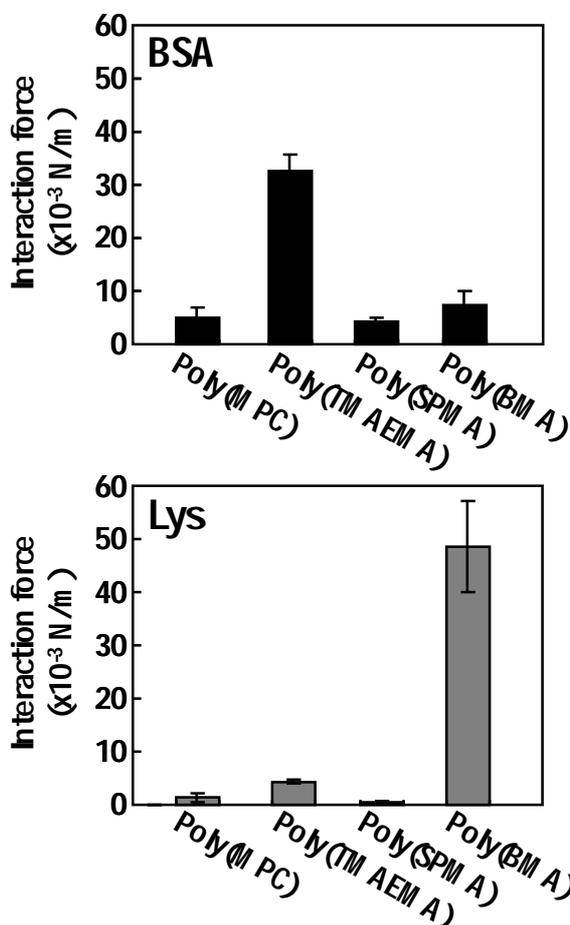


図 3. ポリマーブラシ表面に対するタンパク質の相互作用。

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。

3. 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し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

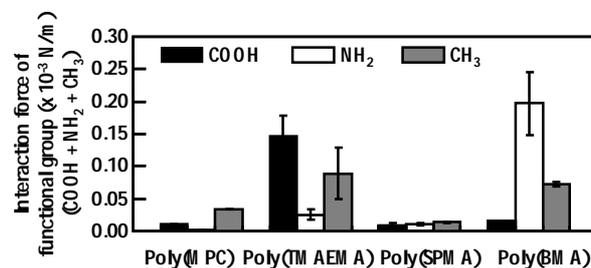


図 4. ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用。

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 4)。選択した官能基はカルボキシル(COOH)基、アミノ(NH₂)基およびメチル(CH₃)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氣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。同時に上述のように、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(NH₃⁺)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。

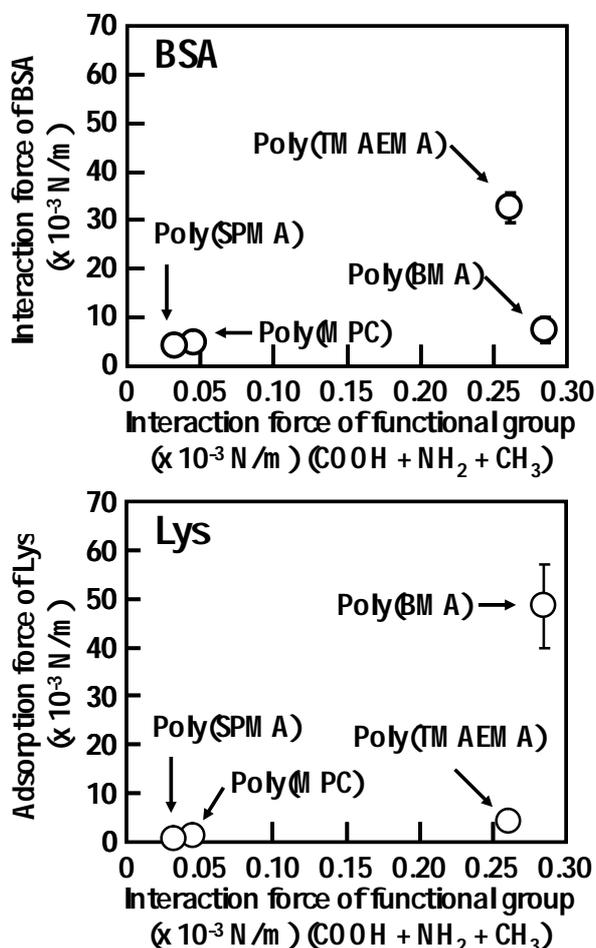


図 5. 各ポリマーブラシ表面におけるタンパク質との相互作用と官能基との相互作用の関係。

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 5 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 5 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。

4. 同種のポリマーブラシ表面間で働く長距離力

図 6 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間に働く遠距離相互作用の表面間距離依存性を示す。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に由来するものであることを示している。つまり、これらの表面近傍では静電的相互作用が支配的に働いていると考えられる。また、疎水性の側鎖を有する poly(BMA) ブラシ表面では、純水中において二表面の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。これらに対し、双性イオン型の側鎖を有する poly(MPC) ブラシ表面では、溶液のイオン強度に依らない弱い斥力のみが観測された。力の働き始める距離が poly(MPC) ブラシ層の膜厚の 2 倍程度の距離であったことから、この力はポリマー鎖の圧縮によるものと考えられる。すなわち、他の表面で観測されたような静電的・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。

同種の表面間のフォースカーブ測定により、各ポリマーブラシ表面で固有に働く相互作用の種類、大きさおよび伝播距離を評価する方法論が確立された。これらのパラメータは、今後タンパク質吸着挙動を理解する上で、有益な情報を与えると考えられる。

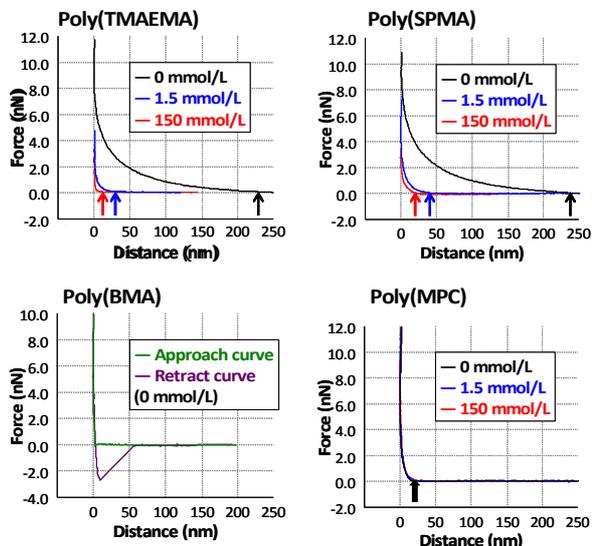


図 6. 様々なポリマーブラシ表面に働く力と表面間距離の関係。

E. 結論

原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定により、材料表面に対する種々の相互作用を定量的に分析する手法を確立した。特に、タンパク質との直接的な相互作用が回避される双性イオン型ポリマーブラシ表面では、官能基との相互作用が検出されなかった。つまり、タンパク質吸着を誘起させないためには、官能基との微細な相互作用を排除することが重要であることがわかった。さらに、双性イオン型ポリマーブラシ表面では、静電的相互作用および疎水性相互作用が働いていなかった。つまり、タンパク質吸着を高度に抑制するためには、官能基との相互作用を引き起こす分子間相互作用を排除する表面設計が必要不可欠であることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
国際標準歯科インプラント材料の有効性及び安全性評価に関する研究

研究分担者 佐々木 啓一 東北大学大学院歯学研究科長

研究要旨

本研究では、アカデミアと独立行政法人医薬品医療機器総合機構が連携し、歯科用インプラントの機械的強度の承認審査で行うべきワーストケース設定やインプラント表面処理方法などに関する考え方を、科学的エビデンスに基づき学術的に検討、整理し、歯科インプラントが真に具備すべき要件を再考し、「課題解決に向けた提言」の取り纏めを行った。本研究をベースとして我が国での審査基準など審査の考え方を再構築することで、申請資料作成の効率化及び審査の迅速化を図り、さらには、新たな国際標準設定に資するものとして、世界に情報発信することにより、国内歯科医療機器産業への波及効果も期待できる。

A. 研究目的

歯科分野の各種医療機器の承認審査において、審査期間の長期化をはじめとするいくつかの課題が指摘されている。殊に、近年、国内外で数多くの新製品が創出されている歯科インプラント分野では、これら課題が顕在化しつつあり、新規製品の上市の遅延が本邦における国際標準の歯科インプラント治療の拡大を妨げる一因となっているとの指摘がある。さらに国産プロダクトの上市遅延が国内企業の競争力を低下させているとの指摘もある。

その解決へ向けて、厚生労働省から平成21年5月に「歯科用インプラント承認基準の制定について」、平成24年7年に「歯科用インプラントの承認申請に関する取扱いについて(Q&A集)」が通知され、具体的な審査の取扱いが示されたところである。しかし、現時点においてもなお、関連団体から申請時に必要な疲労試験における機械的強度の評価項目の明確化や簡素化が求められるなど、未だ課題を残している。

また厚生労働省は、平成21年12月にとりまとめた「医療機器の審査迅速化アクションプログラム」に基づき、審査迅速化に取り組んでいるところであり、全体としては審査期間の改善がみられている。しかし歯科分野の審査については依然、長期化している品目も多く、業界団体からも更なる改善が求められている。これら背景から、承認申請が多い歯科インプラントの審査の改善は急務となっている。

そこで本研究では、承認審査で特に課題となっている歯科用インプラントの機械的強度の審査におけるワーストケース設定の根拠や、インプラント表面処理方法などに関する考え方を、科学的エビデンスに基づき検討、整理し、歯科インプラントが具備すべき要件を再考することを目的とした。

本研究の成果を基盤とし、本邦での審査基準等、審査の考え方を再構築することで、申請資料作成の効率化および審査の迅速化を図るとともに、新たな国際標準の設定に資するものとして世界に情報発信することにより、国内歯科医療機器産業への波及効果も期待できる。

B. 研究方法

本研究では、現在の歯科インプラント承認審査の課題を抽出、科学的な根拠に基づき、その解決策を検討することを目的とするため、歯科インプラントに関連する学会や大学等からの研究者(アカデミア)と、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)とが密に連携し、研究を遂行した。
具体的には、以下のように行った。

歯科インプラントに関連する代表的な学会である、公益社団法人日本補綴歯科学会、公益社団法人日本口腔インプラント学会、一般社団法人日本歯科理工学会等が連携した上で検討することとし、まずは歯科インプラントの承認審査のうち、特に歯科インプラントの機械的強度のワーストケース設定の根拠や、インプラント表面処理方法などの考え方について審査側と申請者側で問題と考えている事項を把握する。

で把握した問題点について、科学的エビデンスに基づき、学術的に整理する。検討に当たっては、国際的な動向も踏まえるとともに、機械的強度に関する評価については実際に有限要素解析法(FEM)を用いた実験を行う。これらの検討を踏まえ、承認審査が円滑に進むための課題解決のための考え方を提言する。本提言は、PMDAにおいて国際標準に整合する審査基準など審査の考え方を再構築するために用いられることが期待できる。

歯科インプラントの承認審査は、材料学的評価、力学的評価、生物学的安全性評価など、多岐に渡るため、効率的かつ迅速にコンセンサスを得るためには、本研究で提案するように、関連する学会の全てが一同に介し、明確な科学的エビデンスに基づき検討することが効率的であり、必要不可欠である。

上記 および を検討するために、下記メンバーにより、3回の研究班会議を開催した。
次ページにその概要を記す。

【班会議構成メンバー】

- 研究分担者
佐々木啓一（東北大学大学院歯学研究科 研究科長・教授、日本補綴歯科学会 理事・元理事長）
- 研究協力者
新家 光雄（東北大学金属材料研究所 研究所長・教授、日本金属学会 理事）
埴 隆夫（東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 研究所長・教授、日本歯科理工学会 理事長）
渡邊 文彦（日本歯科大学新潟生命歯学部 教授、日本口腔インプラント学会 理事長）
古谷野 潔（九州大学歯学研究院 教授、日本口腔インプラント学会 理事・学術委員長、日本補綴歯科学会 理事・前理事長）
矢谷 博文（大阪大学大学院歯学研究科 教授、日本補綴歯科学会 理事長）
窪木 拓男（岡山大学大学院医歯薬総合研究科 歯学部部長・教授、日本補綴歯科学会 理事・学術委員長）
東藤 貢（九州大学応用力学研究所 准教授）
金高 弘恭（東北大学大学院歯学研究科 准教授、PMDA医療機器審査第二部）

なお、班会議にはオブザーバーとして、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）の関係部署（医療機器審査第二部および第三部、規格基準部）が参加して、審査の現状や問題点を説明した。

【第1回研究会議】

- 日時：平成26年2月7日（水）17:30～19:00
場所：「東京八重洲ホール」412号室
内容：本研究の目的および承認審査の現況について、厚生労働省やPMDAより説明があり、その後、班員間の議論により、承認審査に関する情報の共有および問題点の整理を行った。

【第2回研究会議】

- 日時：平成26年3月17日（月）17:30～19:30
場所：「フクラシア東京ステーション」6階 会議室A
内容：歯科インプラントに関して承認申請を行った実績を持つ国内外の企業を数社招聘し、申請者側から見た現状での承認審査の問題点および要望、意見をヒアリング調査した。これにより企業側が考える承認審査における問題点の整理を行った。

【第3回研究会議】

- 日時：平成26年3月24日（水）15:30～17:00
場所：「東京八重洲ホール」511号室
内容：第1回および第2回班会議において抽出した審査側（PMDA）および申請者側からの課題について整理、集約し、科学的な根拠に基づき学術的に検討し、「課題解決に向けた提言」として取り纏めを行った。

（倫理面への配慮）
本研究はヒトを対照としていないため、該当なし。

C. 研究結果

（1）現在の歯科インプラント承認審査の問題点の整理

歯科インプラントの機械的強度の評価におけるワーストケースの設定などに関する考え方を検討するため、承認審査における問題点について審査側、申請者側から意見を聞いて検討すべき論点を明確にしたところ、結果は下記のとおり。

歯科用インプラントの審査における諸問題：審査側からの意見（第1回班会議）

- 1) 歯科用インプラントの承認審査
歯科用インプラントの審査方針等については、平成21年5月に承認基準を策定した。
現在は、その解釈通知（Q&A）を示しながら、承認基準の範囲内で評価出来る申請（承認基準あり品目）と、承認基準の範囲を超えた評価を必要とする申請（承認基準なし品目）とに区分して審査を行っている。
- 2) 承認基準制度後の申請状況
承認基準が制定された平成21年より前は、形状の同一性による評価が一般的で、疲労強度試験の考えが申請者に浸透していなかった。
このため、Q&Aによって疲労強度試験に関して周知を図ってきたが、承認基準の考え方、一品目の取扱い、審査の考え方などが必ずしも明確でなかった。そこで平成24年7月に、Q&Aを全面的に改正し、考え方の明確化を図った。
- 3) 申請品目の現状
申請された歯科インプラントの種類としては、アバットメントだけを見ても、現状ではストレート、アングル、ボール、キャストブル、切削加工して使用するもの、マルチピース等があり、さらにそれぞれのアバットメントで、原材料の異なるタイプが含まれるなど、1品目内（1申請内）においても、その構成内容が多岐に及ぶものが申請されている。
そのため、申請品目の疲労強度評価によるワーストケースの選定は多様であり、統一的な考え方には到っていない。
現行の審査では、申請内容の個々のバリエーションにおいて、それぞれワーストケースの選定を行い、その疲労強度を評価しているが、選定理由等についての基本的な考え方について違いがあることから審査に時間を要する品目がある。

4) ワーストケースの考え方

2ピースタイプ、または3ピース以上のタイプ（マルチピースタイプ）の組合せから構成される歯科インプラントについて、疲労強度試験におけるワーストケースの基本的考え方は、以下のとおりである。との構成にて組み合わせられた検体をワーストケースと判断している。

フィクスチャ：各嵌合部種類において、最も細く、最も短いもの。

アバットメント：各バリエーションにおいて、最も細く、最も長いもの。

各バリエーションは以下a～eが代表例。

- a) 既製のアバットメント
- b) 切削加工するアバットメント
- c) キャスタブルアバットメント
- d) マルチピースアバットメント
- e) ボールアバットメント

a)～d)については、それぞれにストレートタイプとアングルタイプが存在する場合があるため、ストレートとアングルは別途評価が必要となる。なお、ワーストケース選定のために、形状の類似性が認められるものについては、有限要素解析（以下、FEMという。）によるリスク評価を行ってもよいこととしている。

5) 問題点等

歯科用インプラントは製品によって形状や構成が多種多様であり、形状からワーストケースを選定することが適切でない場合や、ワーストケースの選定根拠の説明と疲労試験の結果が異なる場合もあり、その妥当性が説明できない場合がある。他方、FEMを用いた場合では、FEMの結果による応力集中部位と実機による疲労試験の破折部位が一致しないケースも多数あり、ワーストケースの選定の判断に的確に利用されるところに到っていない。

歯科用インプラントの業事承認における問題点と要望：企業側からの意見（第2回班会議）

歯科用インプラントの機械的強度の評価において、以下の各項目の考え方が必ずしも明らかにされておらず、明確化が必要である。

1) ワーストケース設定基準の明確化

- ・ISO14801規格に準拠した設定
- ・インプラント（フィクスチャ・アバットメント）形状からの設定根拠の明確化
 - ・長さ
 - ・径
 - ・アングルの有無
 - ・嵌合機構の形状

2) FEM解析データ活用方法の明確化

- ・疲労試験との相関性の提示の必要性
- ・妥当性の評価の在り方
- ・原料違いの場合の評価の在り方

3) FDAでの評価データ受入の可否

- ・ストレート、アングルでのワーストケース選定
- ・代表ケースでのデータ受入の可否

4) 既承認品をコントロールとする疲労試験実施の必要性

- ・規格値の設定の可否
- ・同一の実験条件の範囲

「課題解決に向けた提言」提案のための論点整理

審査側と申請者側から意見を聞いた結果、疲労試験におけるワーストケースの設定について双方の考え方が一致していない点が多く見受けられた。したがって、本研究班においては歯科用インプラントの審査的明確化、適正化を図るべく、臨床的観点、工学的・材料学的視点を踏まえて、今後の審査におけるワーストケースの選定の考え方について、科学的な根拠に基づき検討、整理し、現時点における考え方を示すこととした。

また、検討に当たっては、国内製造品、外国製造輸入品とも、形状、嵌合部、材質等、様々な製品が製造されていること、例えば、フィクスチャの選定など、各国における臨床現場での使用実態に違いがあること、製品自体の強度を評価することは重要であるが、実際に使用される際のインプラントの強度は臨床現場での使用状況によっても変わり得るものであること等の状況を十分考慮した上で、我が国におけるワーストケース選定の考え方を合理的に定め、承認審査では個別製品に応じて柔軟に判断することが必要と考えられた。

以上を踏まえ、「課題解決に向けた提言」提案のために検討が必要な論点を以下のとおり整理した。

【論点】

- 1) 疲労試験のワーストケース選定の基本的考え方（臨床現場の使用実態、工学的評価の観点）
- 2) FEM解析データの適切な活用方法
- 3) FDAでの評価データ受入のための方策
- 4) 既承認品との比較の必要性

（2）追加評価実験の実施

方法

疲労試験における機械的強度評価におけるワーストケース設定に関し、FEMにおける簡略モデルの可能性を検討する目的で、JFEテクノロジー（株）に委託し、有限要素解析法（FEM）を用いた実験を行った。

フィクスチャ/アバットメント/アバットメントスクリューからなる歯科用インプラント（3.3）を基本に、アバットメントに荷重を作用させるための半球治具を付加したものを基本モデルとした。

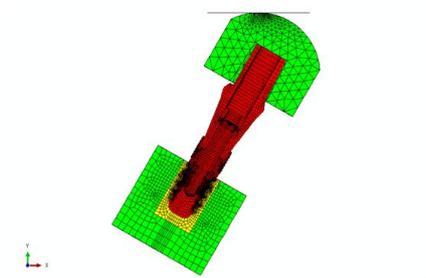
さらに、アバットメント半球治具の構造を変化させた2つの簡略モデルを作成し、計3ケースにつき弾性FEM解析（ISO14801準拠）を行い、各部材に発生する応力状態を比較した。

今回はあくまでも下記の実験条件での結果であり、今後、実機試験とのバリデーションを要する。

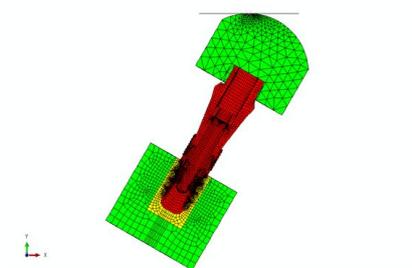
【解析した3ケースのモデルの特徴】

- ・基本モデル
 - ・全部品とも形状省略しないオリジナルモデル
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離:13.5mm (包埋平面と荷重中心との距離:11mm)
- ・簡略モデル
 - ・アバットメントの荷重中心から上部の2.5mm削除
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離:11mm (包埋平面と荷重中心との距離:11mm)
- ・簡略モデル
 - ・解析には、最も簡略化したモデル
 - ・アバットメントの荷重中心から上部の2.5mm削除
 - ・半球治具を削除
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離:11mm (包埋平面と荷重中心との距離:11mm)
 - ・アバットメント上部端面に(仮想)剛体面を取り付け、荷重中心に荷重を負荷

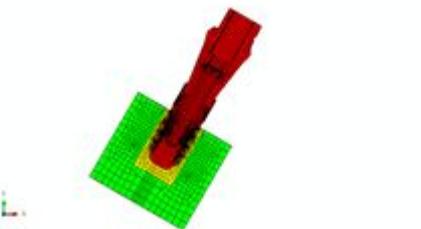
・基本モデル



・簡略モデル



・簡略モデル



実験結果

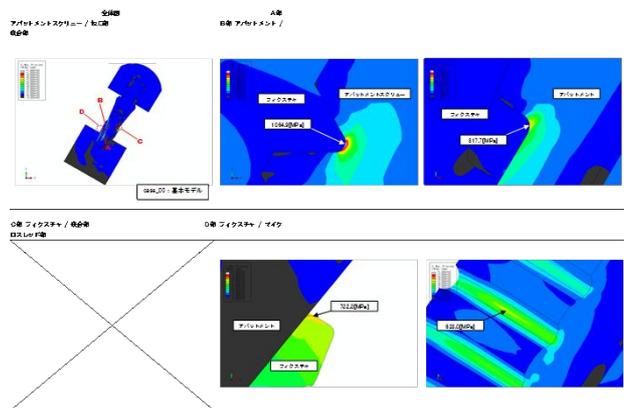
アバットメント~半球治具の構造を変化させた3ケースのインプラントについて、ISO14801の圧縮疲労試験に準拠した強度解析(3次元弾性FEM解析:荷重100[N])を行い、下記の結果を得た。

- 1)包埋平面と半球荷重部の中心との距離が11mm以上の部位については、削除しても最大主応力分布には影響しない。
- 2)解析した範囲内では、半球治具を削除しても最大主応力分布に影響がなかったことから、解析モデルの簡略化についての可能性が示唆された。

【結果1】

・基本モデル

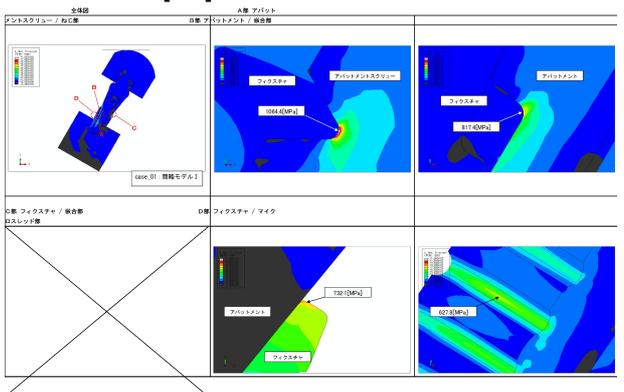
100[N]負荷時の最大主応力分布図



【結果2】

・簡略モデル

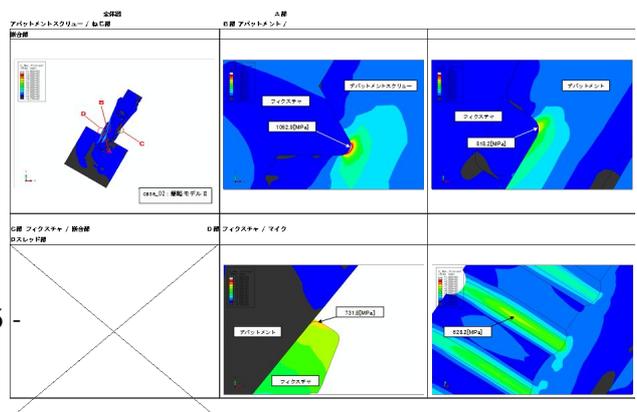
100[N]負荷時の最大主応力分布図



【結果3】

・簡略モデル

100[N]負荷時の最大主応力分布図



【各ケースで高応力となる4部位の最大主応力】

ケース	(A)	(B)	(C)	(D)
case_00 基本モデル	1064.9	817.7	732.3	628.0
case_01 簡略モデルI	1064.4	817.4	732.1	627.8
case_02 簡略モデルII	1062.9	818.2	731.8	628.2

(3) 米国FDAでの評価の考え方

申請者側からのヒアリングにおいて、FDAでの評価データの受け入れの可否について意見があったが、FDAはISOとは異なる試験方法及びワーストケースシナリオの考え方をガイダンスで推奨しており、その概要は以下のとおりである。

- ・静的圧縮試験を行い、その80%の荷重から開始し、疲労限に達するまで疲労試験を行う。(4荷重以上、12検体以上試験すること。荷重数を減らす方法をとる場合には選択した荷重にて5検体すべて破壊しないことを確認する)
- ・金属材料の疲労試験は水中環境下にて荷重繰返し速度2Hzで 2×10^6 サイクルまで行う。
- ・使用前に加工されるアバットメントは加工後の状態にて、最も角度の大きいアバットメントを用いる
- ・20°以下のアングルアバットメントであっても、アングルアバットメントの角度付き部分の軸より10°大きく固定するのではなく、インプラント軸から最低でも30°の角度を成すように固定し試験を行うこと。

(4) 国際標準歯科インプラント材料の有効性・安全性評価法の構築

本研究での成果、すなわち抽出された課題ならびに課題に対しての科学的な検証結果に基づき、我が国での歯科インプラント審査基準等、審査の考え方を検討した結果得られた「課題解決に向けた提言」を下記に示す。

本提言内容は引き続き整理が必要な点もあるが、これを基盤として、将来的には、国際標準に整合した日本発の国際標準インプラントを世界に情報発信することを目指す。

【課題解決に向けた提言】

1) 基本方針

- ・疲労試験は、ISO14801規格に準じるものとする。
- ・ISO14801規格に基づく疲労試験は、歯科インプラント複合体に関する評価であり、歯科インプラントの構成体の疲労強度を評価する。そのため、骨等の生体に対する評価とは切り離して考えなければならない。
- ・ワーストケースの選定については、臨床での使用も考慮することが重要であり、このような考え方が併せて議論されているISOの検討状況も十分勘案する。

2) ワーストケースの選定

インプラント体(フィクスチャ)の形状

- ・インプラント体の直径
 - ・包埋平面での断面の径が最小のものを選択
 - ・インプラント体の頸部が細いタイプにおいても、径の変化を考慮し、包埋平面断面で最小径となるものを選択
- ・インプラント体の長さ
 - ・ISO14801では、インプラント体を包埋固定し、荷重を付加するため、基本的にはインプラント体の長さに関する評価は困難である。長さ8mm未満のインプラント体はそもそも包埋が困難であるため試験系で用いることは現実的ではなく、8mm未満のインプラント体の包埋平面での断面の径が最小であっても8mm以上で最も短い検体にて疲労試験すること。よって、8mm以上のインプラント体の長さは評価されていると判断することは可能と考えられる。

アバットメントの形状

- ・各バリエーションにおいて、最も径が細いものを選択する。
- ・長さについては、包埋平面と半球荷重部の中心との距離がISO規格の11mmとすることを基本とする。
- ・長さが大きく変わらない場合には、径が優先される。

なお、以下に関しては現状での考え方であり、今後、さらなる検討を行う。

- ・ストレートとアングルは、別途の評価が必要である。
- ・アバットメントで現在考えられるバリエーションのうち、以下のものについては、流通する形態そのものではなく、臨床現場で用いるための加工後に想定される径・角度を用いる。
 - a) 切削加工するアバットメント
 - b) キャスタブルアバットメント
 - c) マルチピースアバットメント

接合部の形状

以下に関しては現状での考え方であり、今後、さらなる検討を行う。

- ・各形状ごとに検討が必要である。
- ・インプラント体とアバットメント、それぞれの材料が同じで、嵌合部が同一形状であれば、破折機序等に鑑みインプラント体またはアバットメントの外形の肉厚がうすいものを選択する。

3) FEM解析データを活用したワーストケースの選定について

ワーストケースの選定に当たっては、2)に基づき判断することが基本であるが、FEMを用いて説明することも可能と考えられるため、FEMをどのように活用できるか考え方を整理した。

現時点でのFEM利用に関する基本的な考え方

- ・FEMの一般的な解析では、静的な荷重条件下での構造体内部の応力分布をみているものであり、繰返し荷重下での疲労試験による破壊強度とは異なるものである。
- ・従って、その数値が比較できるものではない。
- ・同一の材料であれば応力集中が高いものほど疲労破壊を起こしやすい、という前提に立つ。

今後の具体的な活用方法

これまでの検討結果から考えうるFEMの活用方法（案）は以下のとおりであるが、今後さらに検討を進める。

今後は、FEMの結果を受け入れ可能とする条件、すなわちFEMのモデル条件、荷重条件等を明示し、それらをフロー図等で作成、提示することが求められる。そのうえでISOへ提案していく。

FEMはワーストケース選定のための解析手法となり得るが、その場合は、申請品目においてFEMにてワーストケース選定が可能である妥当性を説明できる必要があり、申請者がその点を十分理解した上でFEM解析を実施する必要がある。

【FEMの活用方法（案）】

- 嵌合機構が同じ場合には、同一原材料のサイズの違いを比較検討することが可能であること。
- 比較する部位以外の試験条件は揃えること。
- 通常はストレートとアングル、その他類似形状、サイズ違いの比較も含めてワーストケースの選定に使用することができること。
- 応力集中度合いの高いものをワーストケースと判断すること。
- 応力集中部位と実機試験の破折部位が一致する必要があること。

FEMにおけるバリデーションの考え方の整理

FEMでの検討結果と実機での疲労試験との相関性について、実験を行いながら、どこまで示すことが可能か今後検討する。

4) その他

審査における課題を解決するためには、1) から3) のほか、以下の点についても今後整理すべきと考えられた。

- ・既承認品を利用した疲労試験の必要性
 - ・比較検討のための既承認品との試験条件の同一性の必要条件を明らかにする。
 - ・規格値の設定
- ・医療現場の状況（使用方法の制限、市販後調査等）からリスクを管理することで評価を簡素化できるかどうか：市販後の管理

D. 考察

我が国は、世界最高水準のモノ作り技術を有しているものの、医療機器に関しては、その多くを輸入に頼っているのが現状である。歯科分野で用いられ

る各種医療機器の状況も同様であり、特に歯科インプラントについては8割以上を輸入に頼っている。現在政府では、医療分野を成長戦略として位置づけており、国内の医療機器産業を活性化し、革新的な製品を世界に先駆けて実用化できるような環境整備の取組を進めている。このためには薬事規制に関する取組も必要であり、承認審査に関しても迅速化に向け産業界のみならず、学・官も含めたオールジャパン体制での対策が急務となっている。

しかしながら、歯科分野、特に歯科用インプラントでは承認審査に時間がかかる品目も多く、上市が遅れることにより、結果的に本邦での国際標準の歯科インプラント治療の展開の遅れ、また国産インプラントの国内・国際競争力の低下等を招く結果となっている。

したがって、本研究により、特に審査において問題となっている歯科インプラントに関して、アカデミアとPMDAが連携して課題を整理し、今後の承認審査が合理的に対応できるような提言を取りまとめた。

現在の状況を作り出している一因は、審査基準や関連のQ&Aがまとめられているものの、当該基準の解釈について、審査側と申請者側の考え方が一致していないことにあると考えられ、その結果として承認審査のやりとりに時間が生じることであった。

承認審査では、有効性・安全性が確認できるデータをもとに評価していくのは当然であり、申請者側でもそのためのデータ収集は必須である。他方、歯科インプラントで今回論点となった機械的強度（疲労試験）は、実際に臨床現場で使用される実態を考えると、製品自体の強度のほか、使用実態等による影響もあることから、一定の合理性をもって製品の強度が確認できれば現時点では大きな問題は生じないと考えられる。

したがって、今回の提言のような考え方を導入することで、疲労試験のワーストケースの選定については合理的な判断ができ、歯科インプラント審査の問題点の一部は改善できるものと考えられる。これにより、我が国での審査基準など審査の考え方を再構築し、申請資料作成の効率化及び審査の迅速化を可能にすることが期待される。

また、申請者側としては、機械的強度に関しては科学的根拠に基づきしっかり説明できるような申請資料を作成する必要があり、特に輸入品を取り扱う場合は海外で試験等が行われているので、海外企業との連携が必須である。今回の提言により申請者の負担も軽減できることが期待される。

さらに間接的な波及効果としては、我が国の最新技術を利用した日本発の世界標準インプラント開発にとって追い風になり、歯科医療機器産業のさらなる向上、発展に寄与するものと考えられる。

本年度には、疲労試験のワーストケース選定の基本的考え方について、インプラント形状における長さ、径、アングルの有無、嵌合機構の形状に関して審査基準に関する提言を取り纏めることができた。

引き続き、最終年度である次年度には、残りの問題点について提言を取り纏めていく予定である。具体的には、FEM解析データの適切な活用方法、既承認品との比較方法などについて、本年度と同様に検討することとする。

E . 結論

関連学会や大学等のアカデミアと独立行政法人医薬品医療機器総合機構とが連携して、現在の歯科インプラント承認審査の様々な課題を抽出、その解決策を検討し、国際標準に整合する有効性・安全性評価を提案することにより、新たな歯科インプラント材料の審査基準を構築するためにコンセンサスを得て、「課題解決に向けた提言」として取り纏めることができた。

F . 研究発表

1. 論文発表

Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Do bashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K.
NKG2D(+) IFN- (+) CD8(+) T Cells Are Responsible for Palladium Allergy.
PLoS One. 12;9(2):e86810, 2014.

Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y.
In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide.
PLoS One. 25;8(11):e81316, 2013.

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 Biomed. Mater. Res. Part A	101	2573-2585	2013
Sakata S, Inoue Y, Ishihara K.	Quantitative evaluation of interaction force between functional groups in protein and Polymer brush surfaces	Langmuir	30	2745-2751	2014
Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y.	In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide	PLoS One	8	e81316	2013