

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05196

研究課題名（和文）医用材料に吸着する超微量タンパク質の高感度絶対定量法の開発

研究課題名（英文）Development of a Highly Sensitive Absolute Determination Method for Ultra-Trace Proteins Adsorbed on Medical Materials

研究代表者

加藤 愛（Kato, Megumi）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・研究グループ長

研究者番号：10415656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では医用材料に吸着した超微量タンパク質の絶対量の高感度かつ高精度な定量法を開発するため、「同位体希釈質量分析を利用したアミノ酸分析（IDMS-AAA法）の改良」「汎用的なタンパク質吸着抑制界面の一つである親水性高分子固定界面の固定化法の最適化」「微量タンパク質の吸着量を定量するのに適した評価系の構築」を行った。親水性高分子固定化処理を施したカバーガラスにモデルタンパク質を吸着させた場合、ほぼ期待通りのオーダーで微量の吸着量を定量可能であることが分かったが、絶対値や再現性などの定量性に課題が見られたことから、固定化法や評価系のプロトコールなどを改良し、引き続き研究開発を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工心臓や人工関節等の医療デバイスへのタンパク質成分の吸着は、移植後の感染、炎症などの引き金となると考えられており、タンパク質吸着抑制は医用材料開発における重要な課題の一つである。一方、従来の定量法では医用材料に吸着する超微量なタンパク質を高感度かつ正確に定量することが出来なかった。本研究では同位体希釈質量分析を利用したアミノ酸分析法を改良し、医用材料に吸着した超微量タンパク質の高感度・高精度な絶対定量を試みた。モデルタンパク質と独自の評価系を用いて定量を行ったところ、ほぼ期待通りのオーダーで定量可能であることが分かったが、定量性に課題があることから、引き続き改良に取り組む。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to develop a highly sensitive and accurate determination method for the ultra-trace amount of proteins adsorbed on medical materials, we have conducted "Improvement of amino acid analysis using isotope dilution mass spectrometry (IDMS-AAA method)", "Optimization of immobilization method of hydrophilic polymer fixed interface, which is one of versatile protein adsorption inhibitory interfaces", and "Development of an evaluation system suitable for quantifying the ultra-trace amount of adsorbed proteins". When a model protein was adsorbed on the hydrophilic polymer-immobilized cover glass, it was found that the trace amount of adsorbed protein could be quantified almost in the expected order, but there were issues with quantitative properties including absolute value and reproducibility. We plan to continue our research and development by improving the immobilization method and evaluation system protocols.

研究分野：分析化学

キーワード：タンパク質 吸着 定量 アミノ酸分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

人工心臓や人工関節等の医療デバイスは先端医療の発展に大きく貢献してきた一方で、移植後の感染、炎症や血液凝固などの合併症は未だ問題となっている。近年の基礎研究の結果、医療デバイスの移植前もしくは移植後初期に吸着する微量のタンパク質成分がこれら合併症を誘起する重要な因子の一つと考えられている。これまで、ポリエチレングリコール（PEG）などの親水性ポリマーによるタンパク質吸着抑制界面が研究され、それらは従来の材料と比較して移植初期の炎症や血栓形成を強く抑制できることから、留置期間の延長に寄与するものの、親水性ポリマー界面に吸着した超微量タンパク質を足掛かりに、さらなるタンパク質の凝集や変性が徐々に進行し、合併症が誘発されることが懸念されている。この仮説を検証するためには、初期段階の超微量吸着タンパク質の正確な定量が求められている。

2. 研究の目的

従来の免疫学的定量法や比色定量法は、タンパク質を抗体もしくは色素の結合により標識して分光学的に検出する間接的な定量法のため、感度や信頼性に乏しい。一方、研究代表者がこれまで取り組んできた同位体希釈質量分析を利用したアミノ酸分析法（IDMS-AAA法）はタンパク質を酸加水分解して得られるアミノ酸を質量分析計で直接定量するため、タンパク質の種類に依存せずに吸着タンパク質の絶対量を検出可能であり、また得られる値の信頼性（精度・確度）も極めて高い。本研究では、このIDMS-AAA法を応用し、汎用医用材料ならび親水性ポリマー界面に吸着するタンパク質の絶対量を、高感度、かつ高精度に定量する方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3項目を検討することで、数 ng/mL オーダーの超微量吸着タンパク質の絶対定量法を開発を試みた。

1) 全ての天然アミノ酸を高感度かつ迅速に定量出来る分析条件の検討

様々な血清タンパク質の定量を可能とするため、現行のIDMS-AAA法を改良し、全天然アミノ酸を定量出来る分離・検出条件を確立した。また、現行法の分析時間は一分析あたり90分と長く汎用性に乏しいため、分析時間を10分程度まで短縮できる条件を検討した。

2) ヒト血清アルブミンをモデルタンパク質とした定量評価法の最適化

認証標準物質であるヒト血清アルブミン（CRM6202-a：特定国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センター）をモデルタンパク質として用い、医用材料の吸着タンパク質定量に適した評価系を確立した。

3) 親水性高分子固定界面に吸着したモデルタンパク質の絶対量の定量

2) で最適化した条件をもとに、親水性高分子固定化処理を施したカバーガラス上に吸着した超微量タンパク質の絶対定量を試みた。また参照実験として、同一のタンパク質溶液の吸着量を本手法と従来法 (QCM-D 法) とでそれぞれ定量し、感度や精度を比較した。

4. 研究成果

1) 全ての天然アミノ酸を高感度かつ迅速に定量出来る分析条件の検討

過去に研究代表者らが確立した IDMS-AAA 法を改良し、全天然アミノ酸を定量出来る分離・検出が可能で、かつ分析時間を 10 分程度まで短縮できる条件を検討した。具体的には APDS (アミノタグワコー, Rapid Commun. Mass Spectromet., 23(2009)1483) を誘導体化試薬として利用した誘導体化 LC/MS によるアミノ酸分析法と、HILIC カラムを利用した非誘導体化 LC/MS を利用したアミノ酸分析の 2 種を検討し、後者の方法においては、既存の方法と比較して感度は保ちつつ、分析時間の大幅な短縮 (88 分/1 分析→23 分/1 分析 (洗浄工程・平衡化の時間も含む)) と測定対象アミノ酸の拡大 (8 種→17 種) を達成することが出来た。

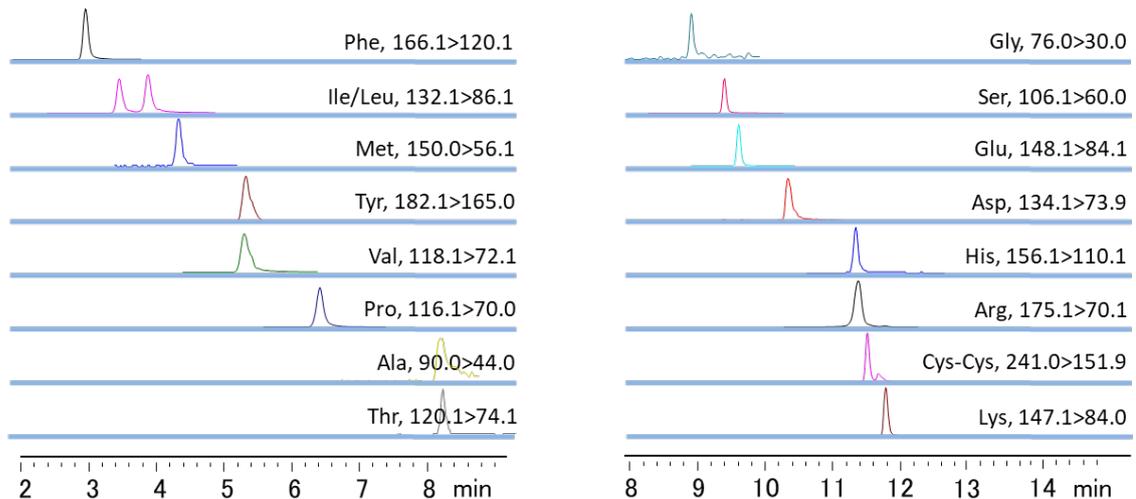


図 1. 構築した測定系による 17 種アミノ酸のクロマトグラム

2) ヒト血清アルブミンをモデルタンパク質とした定量評価法の最適化

モデルタンパク質であるヒト血清アルブミン認証標準物質を約 100 倍希釈したもの (0.7 mg/mL) を用いて、加水分解条件の検討を行った。結果、加水分解時間については 6 時間以上で十分であることが分かった。また、17 種類中、Cys-Cys, Gly, Thr, Tyr を除く 13 種類のアミノ酸については定量が可能であることが分かった。また、医用材料のモデル基材としては金コーティングしたカバーガラスを用い、吸着評価のために必要なカバーガラスサイズ、液適量、サンプル

濃度の最適化を行った。

3) 親水性界面に吸着したモデルタンパク質の絶対量の定量

汎用のタンパク質吸着抑制界面である親水性高分子固定化処理を施したカバーガラスと未処理のカバーガラスに吸着反応を行った後、溶液中に残存するアルブミン濃度を定量したところ、期待通り「吸着操作なし>親水性高分子固定界面>未処理界面」の順で濃度の高低傾向がみられた(図2)。また各々の溶液濃度の差分から得られるカバーガラス上へのタンパク質の吸着絶対量についてもほぼ期待通りのオーダーでの定量値が得られた。一方、親水性高分子固定界面を試料とした際の測定再現性が未処理界面に比べて大きいことや、得られた吸着絶対量を他の定量法(QCM-D法)での定量結果と比較したところ1オーダーの乖離があること等、定量性に課題が見られることから、親水性高分子固定界面の作製法や吸着評価のプロトコールなどを改良し、引き続き研究開発を進める予定である。

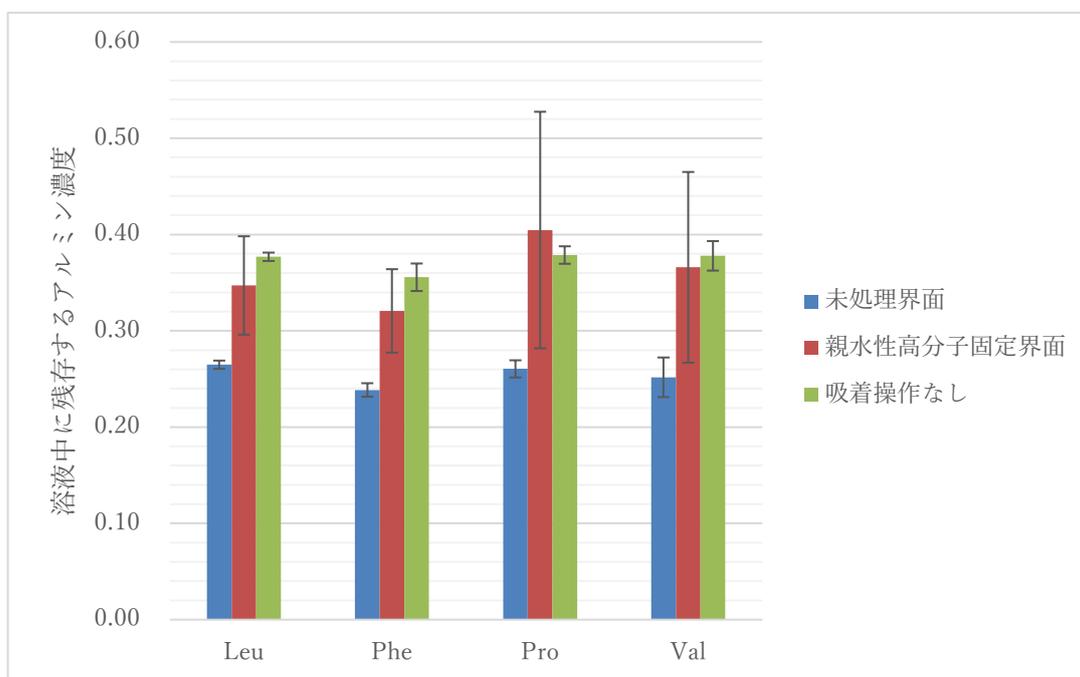


図2. 各界面に対するアルブミンの吸着評価

吸着反応後、溶液中に残存するアルブミン濃度はアミノ酸分析(1種類の試料につき2本の加水分解と3回測定を実施)により求めた。4種のアミノ酸各々の定量値はアルブミン1分子に含まれる分子数を加味することで、アルブミンとしての濃度に換算している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aldona Mzyk, Gabriela Imbir, Yuri Noguchi, Marek Sanak, Roman Major, Justyna Wiecek, Przemyslaw Kurtyka, Hanna Plutecka, Klaudia Trembecka-Wojciga, Yasuhiko Iwasaki, Masato Ueda, Sachiro Kakinoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamic in vitro hemocompatibility of oligoproline self-assembled monolayer surfaces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 5498-5503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2BM00885H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakinoki Sachiro, Kitamura Makoto, Noguchi Yuri, Arichi Yuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Effect of residue insertion on the stability of polyproline-I and II structures: Circular dichroism spectroscopic analyses of block-type oligo-prolines (Pro) _m -Gly/Ala-(Pro) _n	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pep2.24170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuri Noguchi, Yasuhiko Iwasaki, Masato Ueda, Sachiro Kakinoki	4. 巻 8
2. 論文標題 Surfaces immobilized with oligo-prolines prevent protein adsorption and cell adhesion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Material Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2233-2237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0TB00051E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柿木佐知朗、松下夕真、埜口友里、Aldona Mzyk、上田正人、岩崎泰彦、Roman Major
2. 発表標題 コラーゲン骨格構造様オリゴペプチド固定表面のin vitro動的環境下における血液適合性の評価
3. 学会等名 第60回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿木佐知朗、松下夕真、埜口友里、Aldona Myzk、上田正人、岩崎泰彦、Roman Major
2. 発表標題 コラーゲン骨格模倣ペプチド固定表面のアンチファウリング特性
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿木佐知朗
2. 発表標題 ペプチドを利用した医療材料表面の生理的活性化と非活性化
3. 学会等名 第5回 日本金属学会 第7分野講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 愛
2. 発表標題 SIトレーサブルなアミノ酸標準物質の開発
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会（オンライン）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 唐川 幸聖、加藤 愛
2. 発表標題 アミノ酸分析のこれまで、これから
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第11回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 愛
2. 発表標題 アミノ酸認証標準物質の開発
3. 学会等名 第74回日本栄養食糧学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 愛、恵山 栄、吉岡 真理子
2. 発表標題 Upgrading of amino acid analysis using hydrophilic interaction chromatography coupled with isotope-dilution mass spectrometry for accurate protein/peptide quantification
3. 学会等名 48th International Symposium on High- Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 愛
2. 発表標題 SIトレーサブルなアミノ酸測定に向けた取り組み
3. 学会等名 第9回新アミノ酸分析研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加藤愛、高津章子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 455
3. 書名 Amino Acid Analysis: Method and Protocol, Second Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	柿木 佐知朗 (Kakinoki Sachiro) (70421419)	関西大学・化学生命工学部・教授 (34416)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ポーランド	ポーランド科学アカデミー治 金・材料科学研究所			