

## 2B-01

### 整形外科向け癒着防止材の開発

株式会社ジェイ・エム・エス 研究開発本部  
 ○井手 純一, 上泉 千草, 山科 憂佳, 山本 敬史

#### 【緒言】

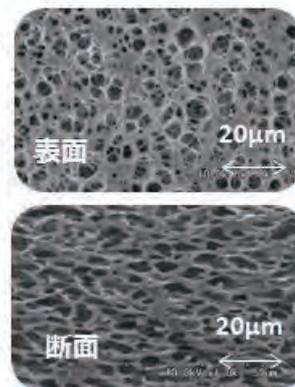
外科手術後に発生する創部の癒着は、患者の健康を害して様々な問題を引き起こす。腹部や骨盤腔の手術では吸収性癒着防止材が広く使用されており、合併症の低減、再手術時の医師および患者負担の軽減などの効果が確認されている。一方、整形外科の手術では、癒着は運動機能障害の原因となり、これを回避するために術後早期のリハビリテーションが行われているが、それでも後遺症が残るケースは多く、重症の場合には癒着を剥離する再手術が行われている。整形外科でも術後合併症を防止する癒着防止材の開発が期待されている。この領域では手術の対象となる運動器官の強度回復を伴う組織修復に4週間を要するため、癒着防止材には4週間のバリア性維持が必要となる。数日~1週間のバリア性維持が求められる腹部外科領域とはこの点が大きく異なる。そこで4週間のバリア性維持と運動器官（腱、筋肉、骨）に使用しても破損しない丈夫で柔軟なフィルムを設計要求事項として整形外科向け癒着防止材を検討した。

#### 【実験】

材料にポリ(L-ラクチド-co-ε-カプロラクトン)を選択して、連続多孔質構造を有する厚み0.1mmのシートを作製した。このシートはドレープ性と伸縮性に優れ、縫合固定ができる物理的強度を有していた。このシートの4週間のバリア維持性能を確認するために、ISO15814に準じてpH7.4のリン酸緩衝液に浸漬させて*in vitro*で分解性を評価した。癒着防止効果は、骨折のプレート固定手術を想定して、ウサギの長母趾伸筋腱直下の脛骨にチタン製プレートを固定して、腱とその周囲組織の間に癒着を形成させるモデルで評価した。



癒着防止シートの外観, SEM像  
 100×100mm, 0.1mm厚



#### 【結果と考察】

*in vitro*分解試験では6週目に約40%の物理強度を保持しており、設計要求事項の4週間のバリア性機能を有することが示唆された。ウサギの腱癒着モデルでは、術後4週間後に術肢を離断して引張試験機で長母趾伸筋腱の引き抜き強度（腱の滑走抵抗）を測定した。その結果、癒着防止材を使用しないコントロール群では腱の癒着により引き抜き強度は平均17Nまで増加したが、癒着防止材を腱の上下に設置した試験群では引き抜き強度は5Nであり、開発品は腱および周囲組織の癒着を軽減することによって腱の滑走抵抗の増加を抑えることを確認した。また、腱および周囲組織に過度の炎症や変性を認めず、優れた生体適合性を有していた。以上の結果から、開発した癒着防止シートは、整形外科における術後の運動機能低下の軽減に有効である可能性が確認された。

#### Development of biodegradable anti-adhesion sheet for orthopedic surgery

Junichi IDE, Chigusa UWAIZUMI, Yuka YAMASHINA, Takashi YAMAMOTO

Research and Development, JMS Co., Ltd.

Tel: +81-82-243-5980, Fax: +81-82-243-5955, E-mail: j-ide@jms.cc

## 医工連携による次世代型脊柱変形矯正用インプラントの開発戦略

<sup>1</sup>北海道大学病院整形外科, <sup>2</sup>北海道大学情報科学研究科, <sup>3</sup>東北大学金属材料研究所  
 ○須藤 英毅<sup>1</sup>, 金井 理<sup>2</sup>, 小甲 晃史<sup>1</sup>, 青柳 健太<sup>3</sup>, 王 昊<sup>3</sup>, 岩崎 倫政<sup>1</sup>, 千葉 晶彦<sup>3</sup>

【緒言】脊椎手術に使用する金属製ストレート形状ロッド材への曲げ形成は、術者の経験や勘に左右され、曲げ加工中に生じる notch (図 1) や残留応力により疲労強度が低下し、術後に折損する恐れがある。我々は、特発性側弯症 (AIS) においてロッド形状により時空的観点を取り入れた解剖学的 4D 矯正が可能なことを世界で初めて実証し (図 2), こうした次世代型手術戦略を容易に実現できる脊柱変形矯正用コバルトクロム合金製インプラントを AMED の医工連携事業化推進事業による支援のもとで開発しているので報告する。

【実験】PMDA RS 戦略相談 (対面助言) による合意を得て、1) AIS に対し後方矯正固定術を行った 47 症例を対象として体内設置前のロッド形状をトレースして得られた中心曲線間の形状差分値を Iterative Closest Point 法により評価後、さらに階層クラスタ分析により最も差分値の小さいロッド形状群を導出し、2) コバルトクロム合金製ロッド 110mm を特殊ジグにより最弯曲 (45°) させたロッド (notch 無) とフレンチベンダーにより曲げ加工したロッド (notch 有) を ASTM F2193 及び F1717 規格を用いて力学試験を行い、3) 電子ビーム 3D 積層造形によるロッド (notch 無) でも同様の試験を実施した。

【結果と考察】1) 最長差分値が 5mm 以内で 10 種類のロッド形状群が導出された。2) notch のないロッドの方が剛性値や疲労強度が高値であった。3) 積層造形ロッドにおいても同様の結果を示した。

情報科学的アプローチによって患者脊柱に理想的な解剖学的脊柱再建をもたらすロッド形状群を合理的に導出した。ベストフィット曲線を中心線とする円断面ロッド形状を直接出力することで 3D 積層造形用データも作成される (PTC 国際出願中)。術中に曲げ加工する必要のない弯曲したロッドを用意することで、術後のロッド折損のリスクや患者に不適切な形状のロッドを使用するリスクを回避できる。現在、術前シミュレーションプログラムも含めた包括的な治療戦略へと展開しており、個別対応化したロッドにより患者負担の軽減や手術時間の短縮が期待される。

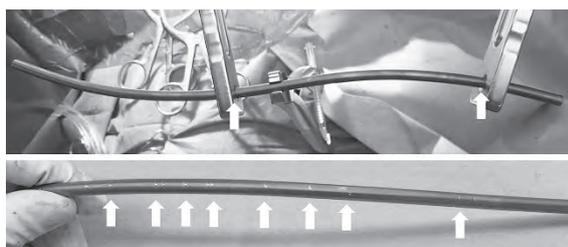


図 1. ロッド曲げ加工により生じる notch

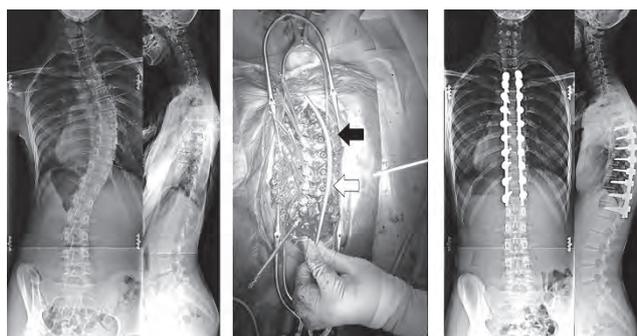


図 2. 解剖学的脊柱再建術

### Next generation strategies for spinal reconstruction implants in spinal deformity

Hideki Sudo<sup>1</sup>, Satoshi Kanai<sup>2</sup>, Terufumi Kokabu<sup>1</sup>, Kenta Aoyagi<sup>3</sup>, Hao Wang<sup>3</sup>, Norimasa Iwasaki<sup>1</sup>, Akihiko Chiba<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Hokkaido University Hospital <sup>2</sup>Hokkaido University Graduate School of Information Science and Technology, <sup>3</sup>Institute for Materials Research, Tohoku University

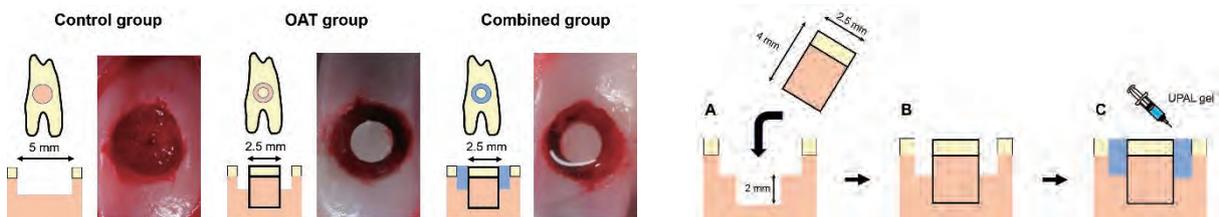
Tel: +81-11-706-5934, Fax: +81-11-706-6054, E-mail: [hidekisudo@yahoo.co.jp](mailto:hidekisudo@yahoo.co.jp)

## 骨軟骨柱移植術に高純度アルギン酸ゲル（UPAL ゲル）移植を併用した治療効果の検討

<sup>1</sup>北海道大学大学院 医学研究院 専門医学部門 機能再生医学分野 整形外科教室  
 ○菱村 亮介<sup>1</sup>, 小野寺 智洋<sup>1</sup>, 宝満 健太郎<sup>1</sup>, 金 佑泳<sup>1</sup>, 濱崎 雅成<sup>1</sup>, 徐 亮<sup>1</sup>, 岩崎 倫政

【緒言】骨軟骨柱移植術（OAT）は骨 - 軟骨複合体としての局所修復が得られる一方、骨軟骨柱（graft）の採取による痛み（donor site morbidity）が懸念される。また graft 移植部周囲の間隙は硝子軟骨ではなく線維軟骨として修復される。そのため graft 採取は最小限が望ましく、graft 間隙の再生組織の改善が求められる。我々は軟骨再生治療における scaffold としてのアルギン酸の併用に着目し、研究を重ねてきた。通常アルギン酸ゲルでは問題となる細胞毒性を低下させた高純度アルギン酸ゲル（UPAL gel）を開発し、軟骨再生の足場として優れた軟骨分化誘導能と高い構造適合性をもつことを報告してきた。今回我々は、OAT に UPAL gel 移植を併用することで、従来よりも少ない graft 使用量で良好な軟骨修復が得られるとの仮説を立てた。本研究の目的は兎の骨軟骨欠損モデルを用いて、本術式の治療効果を検討することである。

【実験】日本白色家兎膝関節に直径 5 mm の骨軟骨欠損を作成した。OAT 施行群では反対側から採取した直径 2.5 mm の graft を移植した。無治療群（Control 群）、OAT 単独群（OAT 群）、OAT + UPAL gel 併用群（Combined 群）に群分けし、術後 12 週における欠損部全体ならびに graft 周辺部の肉眼的（n=10）、組織学的評価（n=10）を行い、graft 自体の軟骨変性についてはさらに詳細に評価した。HE 染色組織検体を用いてコラーゲン配向性の評価（n=10）を行った。修復組織と graft における力学強度の評価（n=5）を行った。Micro-CT を用いて、再生された軟骨下骨の骨量と graft 生着率を評価した。統計処理では 3 群間比較には Steel-Dwass 検定を、2 群間比較には Mann-Whitney U 検定を使用した。



【結果】Control 群では十分な組織修復は得られず、OAT 群では graft 周囲の間隙は主に線維性組織で満たされていた。一方で、Combined 群では表面が均一で半透明な組織により覆われ、主に硝子様軟骨組織で修復されていた。Combined 群は他群に比べ、肉眼的・組織学的スコアリングで有意に優れていた。また graft の変性は Combined 群（ $12.6 \pm 3.50$ ）が OAT 群（ $6.80 \pm 2.20$ ,  $P = .0023$ ）よりも有意に少なかった。修復部におけるコラーゲン配向性は Combined 群で有意に優れていた。力学強度では Combined 群が Control 群と OAT 群の両群に比べ有意に優れていた。軟骨下骨の骨量と graft 生着率は両群においてほぼ同等であった。

【考察】OAT に UPAL gel 移植を併用することで、軟骨下骨の修復を阻害することなく、良好な軟骨修復及びブグラフト保護作用を示した。また修復軟骨と移植グラフトにおいて良好なコラーゲン配向性と力学特性がえられた。本術式は OAT における donor site morbidity のリスクを軽減し、良好な組織修復が得られる可能性がある。また、これまで OAT 単独では治療できなかった広範囲軟骨欠損に対しても、適応が拡大できる可能性が考えられた。

### Biomaterials: Their Development and Translational Studies

Ryosuke Hishimura<sup>1</sup>, Tomohiro Onodera<sup>1</sup>, Kentaro Homan<sup>1</sup>, Woo Yong Kim<sup>1</sup>, Masanari Hamasaki<sup>1</sup>, Liang Xu<sup>1</sup>, Norimasa Iwasaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University

Tel: +81-11-706-5936, E-mail ; hishi\_piero@yahoo.co.jp

## OCP/Collagen の実用化

<sup>1</sup>東洋紡株式会社 メディカル事業推進部, <sup>2</sup>東洋紡株式会社 総合研究所 医療機器開発センター  
<sup>3</sup>東北大学大学院医工学研究科, <sup>4</sup>東北大学大学院歯学研究科

○甲斐壮馬<sup>1</sup>、松林秀繁<sup>1</sup>、岩井敦史<sup>1</sup>、梶井文彦<sup>1,2</sup>、田中秀典<sup>1</sup>、西田光夫<sup>2</sup>、浅井治夫<sup>1</sup>、  
 鎌倉慎治<sup>3</sup>、松井桂子<sup>4</sup>、川井 忠<sup>4</sup>、高橋 哲<sup>4</sup>

歯はその周囲を健康な骨で囲まれてこそ十分に機能を果たします。従って、骨欠損（歯を支えるべき顎の骨がなくなること）が生じると、咀嚼障害（ものが噛めない）、審美障害（見た目が悪い）、構音障害（言葉がうまく伝わらない）などの不具合が生じます。実際、歯科・口腔外科では多くの骨欠損を伴う疾患があり、それらの障害が明確な場合、本来骨であるべき部分が失われた状態に再び骨をつくる「骨再生」が必要となります。現行の人工骨では「骨再生」は難しく、未だに医療現場でも信頼できる「骨再生」治療法は自家骨移植という患者様自身の健康な骨を採取して病変部の治療に用いる方法です。

東北大学と日本ハム（株）は生体内分解吸収性の骨再生誘導材リン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体（以下、OCP/Collagen）を共同研究にて開発しました。OCP/Collagen は優れた骨再生能、細胞や成長因子の補充無しで骨再生を実現、OCP/Collagen からできた骨は元の骨と同等な性質を示します。そこで、東北大学は OCP/Collagen を用いて歯科領域での臨床研究を行いました。臨床研究では、OCP/Collagen を抜歯窩、嚢胞腔に適用し、骨欠損に対して良好な骨再生を示しました。

これらの知見をもとに、東洋紡（株）が OCP/Collagen の実用化を目指し、2015 年 4 月より東北大学を主幹施設として全国 9 つの医療機関において歯科口腔外科領域での治験を開始しました。現在、製造販売承認申請中であり、2018 年度からの本格販売を目指しております。本治験はその前に取り組んだ神経再生誘導チューブ「ナーブリッジ」の経験が随所に活かされており、審査部門である医薬品医療機器総合機構 PMDA との対話を重ね、かつ、治験を実施する病院関係者、治験支援機関 CRO との連携をはかり、関係者総出で製品化を目指して取り組んできました。さらには、骨再生誘導材 OCP/Collagen は歯科口腔外科のみならず、骨欠損補填材、骨欠損修復材として、頭頸部、顎顔面、整形外科、形成外科など、複数診療科における適用を視野に入れております。

今後も患者様の負担を減らし、QOL の向上や社会復帰の一助となる医療機器の実用化を目指し、取り組んでいきたいと考えている。

。

---

### Application for OCP/Collagen

Soma Kai<sup>1</sup>, Hideshige Matsubayashi<sup>1</sup>, Atsushi Iwai<sup>1</sup>, Fumihiko Kajii<sup>1,2</sup>, Hidenori Tanaka<sup>1</sup>, Mitsuo Nishida<sup>2</sup>, Haruo Asai<sup>1</sup>, Shinji Kamakura<sup>3</sup>, Keiko Matsui<sup>4</sup>, Tadashi Kawai<sup>4</sup>, Tetsu Takahashi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> TOYOBO Co.,Ltd. Research and Planning Group, Medical Business Promotion Department

<sup>2</sup> TOYOBO Co.,Ltd. Research Institute, Medical Device and Device Development Center

<sup>3</sup> Tohoku University. Graduate School of Biomedical Engineering

<sup>4</sup> Tohoku University. Graduate School of Dentistry

Tel: +81-6-6348-3336, Fax: +81-6-6348-3696, E-mail: [Soma.Kai@toyobo.jp](mailto:Soma.Kai@toyobo.jp)

## リコンビナントペプチド「セルネスト」を用いた骨補填材の開発

<sup>1</sup>富士フイルム株式会社バイオサイエンス&テクノロジー開発センター

○我妻 昭彦<sup>1</sup>, 岡村 愛<sup>1</sup>, 平塚 崇浩<sup>1</sup>, 柿沼 千早<sup>1</sup>, 前川 敏彦<sup>1</sup>, 畠 賢一郎<sup>1</sup>

### 【緒言】

富士フイルム株式会社では I 型コラーゲンの配列に由来するリコンビナントペプチド「セルネスト」を開発し、その優れた細胞接着性を活かしバイオマテリアルとしての可能性を追求してきた。その結果、セルネストの活用法の一つとして、骨補填材としての有用性が示唆されており、顆粒状を始めとして様々な形態において骨補填材となり得ることが分かってきた。本発表ではセルネストをスポンジ状の形態を持つ顆粒に製した歯科用の骨補填材 FBG (FUJI BONE GRAFT) の安全性試験について発表する。

FBG は医療機器であることから ISO10993 に則った試験が必要である。また、上下顎骨に埋植する材料としての使用を意図しており、埋植材料であることから生物学的安全性試験の考え方に則り、細胞毒性、感作性、刺激性、急性毒性、遺伝毒性、埋植試験を実施した。また、蛋白性の新規バイオマテリアルを使用した医療機器となることから、更に慢性毒性、がん原性、発生生殖毒性、免疫原性に関する試験について考慮する必要がある。本試験では特に慢性毒性及びがん原性に関する試験及び考察の結果を報告する。

### 【実験】

イヌの左右下顎歯（第三小臼歯、P3）の遠心根のみを抜歯後、抜歯窩に FBG の適用（コラーゲン膜あり）及び抜歯のみ（非適用、コラーゲン膜あり）を反対側に設定し、抜歯・適用後 1, 3 及び 6 カ月に歯槽骨の形態比較を行う有効性試験を行うと同時に、各群に左右下顎第三小臼歯の抜歯のみ（非適用、コラーゲン膜無し）及び 6 カ月群に無処置（非抜歯）を設定し、全例について安全性に関連する比較検査を実施した。試験項目は適用部位及び主要組織に対する病理組織学的検査、血液生化学検査、血液検査、尿検査を行った。

### 【結果と考察】

抜歯・適用部位の病理組織学的検査では、抜歯窩において好中球浸潤、リンパ球浸潤、形質細胞浸潤、マクロファージ浸潤、線維化、血管新生あるいは出血、新生骨、新生骨面の骨芽細胞及び新生骨の骨梁の肥厚が各群の FBG の適用部並びに抜歯のみの部位にそれぞれ認められ、発現の程度は同等であった。FBG 適用部位における被験物質の残存は、経時的に漸減する傾向を示し、6 カ月群では 1 例のみごく僅かな残存を認めたが、その他は全て消失していた。

一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検所見、抜歯・適用部位以外の病理組織学的検査に被験物質適用に起因すると考えられる変化は認められなかった。

以上より、安全性関連検査で FBG 適用に起因する変化は認められないものと結論した。また、がん原性については本品は単回投与であり、移植 6 ヶ月後にはほぼ吸収されており、病理学的検査の結果、前がん病変を含め異常は認められなかったため、がん原性試験を実施する必要はないものと考えられた。

---

### Development of Bone Graft Material Using Recombinant Peptide “Cellnest”

Akihiko Azuma<sup>1</sup>, Ai Okamura<sup>1</sup>, Takahiro Hiratsuka<sup>1</sup>, Chihaya Kakinuma<sup>1</sup>, Toshihiko Maekawa<sup>1</sup>, Kenichiro Hata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioscience & Technology Development Center, FUJIFILM Corporation.

Tel: +81-465-85-4362, Fax: +81-465-86-1019, E-mail: akihiko.azuma@fujifilm.com

## バイオマテリアルの *in vitro* 生体活性評価法の標準化に向けて -GLOBAL プロジェクト

<sup>1</sup>中部大学生命健康科学部, <sup>2</sup>Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, Italy

○山口 誠二<sup>1</sup>, 高玉 博朗<sup>1</sup>, Sara Ferraris<sup>2</sup>, Enrica Verné<sup>2</sup>, Francesco Baino<sup>2</sup>, Marta Miola<sup>2</sup>, Veronica Peretti<sup>2</sup>, Silvia Spriano<sup>2</sup>

【緒言】生体内にバイオマテリアルが埋入されると、その表面には、まず、体液中の水分子及び無機イオンが接触し、次いでたんぱくが吸着される。その後、細胞が接近し表面状態に応じて活性化される。さらに、体外から細菌が飛来する。この一連の生体反応を *in vitro* で評価する手法として、擬似体液 (SBF) 浸漬試験、たんぱく吸着試験、細胞試験が広く用いられている。しかし、それらのプロトコルは研究室によって異なり、研究室間の結果を比較するのが困難な場合が多々ある。SBF 浸漬試験におけるアパタイト形成は *in vivo* 試験における骨結合能の序列とよく一致すると報告されているものの、バイオマテリアルの多様化により一部例外も報告されている。一方、抗菌性評価においては、標準的な方法はなく、工業規格が転用されている。

我々は、多様化したバイオマテリアルの生体活性及び抗菌性を精度よく評価する手法の開発と標準化を目指し、中部大学と Politecnico di Torino (イタリア) 二国間で GLOBAL プロジェクト (GuideLines for the setting-up of a prOtoCol for characterizing Bioactive and Antibacterial biomaterials) を通じて 2017 年 1 月より先導研究を行ってきた。本研究は生体活性評価に関する進捗を報告する。

【実験】生体活性を有する  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-B}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3$  ガラス (SBA2)、NaOH-HCl-加熱処理を施した Ti 金属 (Ti (A-HC-H))、NaOH-加熱処理、NaOH-CaCl<sub>2</sub>-加熱-温水処理及び HF-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を施した Ti-6Al-4V 合金 (それぞれ、Ti64 (A-H)、Ti64 (A-Ca-H-W)、Ti64 (HF-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)) 試料を既知の手法に従って作製した。これらの試料の一部を SBF に 30 分~28 日間浸漬した。処理後及び SBF 浸漬後の試料を薄膜 XRD、Raman、SEM、XPS、ゼータ電位測定により分析した。

【結果と考察】XRD 及び Raman 分析によると、いずれの試料においても検出される結晶相の種類に差はなかったが、Ti64 (HF-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に形成された約 400nm の薄い表面層は Raman 分析のみにより検出可能であった。これらの結果はナノメートルスケールの薄層の結晶構造の同定には Raman 分析が有用であることを示唆している。SBF 中での Ca 及び P の吸着挙動を XPS で分析したところ、試料間でこの吸着順序が異なることが明らかになった。これらはいずれも長期間浸漬後にアパタイトを形成した。また、希釈した SBF 中における試料のゼータ電位を測定したところ、図 1 に見られるように SBA2 の表面電位が浸漬直後から急激に上昇した。これは、SBA2 表面における溶解及びイオン吸着反応が速やかに進んでいることを示している。

これらの結果より XRD、Raman、XPS、ゼータ電位測定は擬似生体環境下の無機イオン反応の測定に有用であると考えられる。本研究の成果は標準化に向けた先導研究の第一段階であり、将来、国際的な連携を目指す際の基礎データとなるものと期待される。

【謝辞】本研究は MAECI-Italy の助成を受けたものです。

### The GLOBAL project- toward the standardization of *in vitro* bioactivity testing for biomaterials

Seiji Yamaguchi<sup>1</sup> Hiroaki Takadama<sup>1</sup>, Sara Ferraris<sup>2</sup>, Enrica Verné<sup>2</sup>, Francesco Baino<sup>2</sup>, Marta Miola<sup>2</sup>, Veronic. Peretti<sup>2</sup>, Silvia Spriano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, Chubu University, Japan

<sup>2</sup> Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, Italy

Tel: +81-568-51-6420, Fax: +81-568-51-5370, E-mail: [sy-esi@isc.chubu.ac.jp](mailto:sy-esi@isc.chubu.ac.jp)

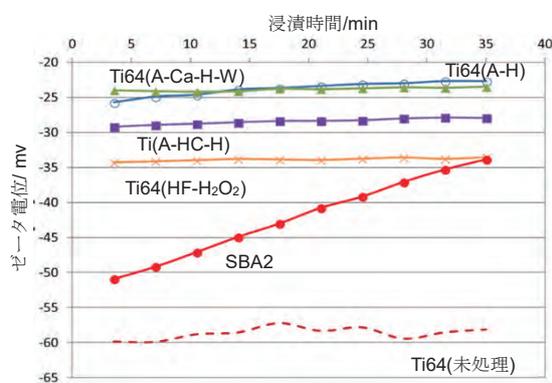


図 1 生体活性ガラス及び生体活性 Ti 金属/合金の希釈 SBF 中におけるゼータ電位の浸漬時間による変化

## 医療技術の QOL デザイン

<sup>1</sup> 京都大学工学研究科  
○富田 直秀<sup>1</sup>

医療が内包している膨大な無駄が解消されなければ、新しい医療技術の事業化は保険制度を基盤とした医療経済を崩壊させる。英国をはじめ、諸外国では医療の質や健康寿命の指標とされる QALY によって、新しい医薬品や医療技術に強い規制を加え、最近では有効な治療法が無い医療ニーズに応える未充足医療領域 (Unmet Medical Needs) 技術や革新的進歩や社会的便益なども加味されて開発費の対費用効果が検討されつつある。しかし、臨床現場では一見なんでもない症状がその人の一生を大きく変える場合もあれば、命にかかわる重大事象でも放置すべき場面は存在する。生活現場において「質」とは何か、をボトムアップに考える姿勢も必要である、また医療現場では、だれよりも患者さん自身が過剰と思われる医療を求める場面が多く、本来はそれを諫めるのが医療スタッフや医療技術開発者の役割である。

本発表では、筆者が医療技術の開発過程(人工関節、軟骨再生、ANSHIN デザイン)において経験した様々な事例をご紹介します、現行の法や規制への傾向と対策によって目先の利益を得る医療技術開発ではなく、長期の持続的的事业となり得る医療技術の QOL デザインの可能性を模索してみたい。

## 参考論文・web :

1. ANSHIN デザインコンセプトブック 2013 : <http://anshin-design.net/link/index.html>
2. 富田直秀, “ANSHIN” デザインプロジェクト, 日本機械学会誌, 117, 1144), 180, 2014
3. 富田直秀, 何が無駄で何が真に有効なのかー「質」で選別される医療技術とデザイン実践, PHARM TECH JAPAN, Vol. 30 No. 7, 111-115 (1275-1279), 2014
4. 富田直秀, 生活の質 (QOL) のデザイン, デザイン学論考 vol. 4, pp3-5, 2015 ([http://www.design.kyoto-u.ac.jp/ronkouweb/vol.4/vol.4\\_01\\_tomita.pdf](http://www.design.kyoto-u.ac.jp/ronkouweb/vol.4/vol.4_01_tomita.pdf))
5. 富田直秀, 物語の可視化: (逐次型弁証法による発見支援), デザイン学論考, vol. 6, pp53-64, 2016 ([http://www.design.kyoto-u.ac.jp/ronkouweb/vol.6/vol.6\\_04\\_tomita.pdf](http://www.design.kyoto-u.ac.jp/ronkouweb/vol.6/vol.6_04_tomita.pdf))
6. 富田直秀 QOL と在宅医療技術: アクチュアリティを育てるデザイン学 日本機械学会誌 118(1155), 60-64, 2015
7. 富田直秀, 人工関節の“ANSHIN” デザイン イキモノを対象としたものづくり, トライボロジスト, 60(11), 721-728, 2015
8. 富田直秀, 再生医療技術の文化としての進歩, 人工臓器, Vol. 44 No. 3, 186-189, 2015
9. 富田直秀, 意味があれば価値があるだろうか, デザイン学論考, vol. 7, pp. 46-54, 2016 ([http://www.design.kyoto-u.ac.jp/ronkouweb/vol.7/vol.7\\_04\\_tomita.pdf](http://www.design.kyoto-u.ac.jp/ronkouweb/vol.7/vol.7_04_tomita.pdf))
10. 富田直秀, 詩的空間についてーヒトをモノ化せず関係性として捉えるアート視点ー, Journal of Integrated Creative Studies No. 2016-023-a, Nov. 2016 (<http://www2.yukawa.kyoto-u.ac.jp/~future/icis/wp/wp-content/uploads/2016/12/2016-023-a.pdf>)

## 参考動画 :

- (病と雑音の香り 1 部) <https://www.youtube.com/watch?v=m2rdNVVCRSA>  
 (病と雑音の香り 2 部 ex. 難聴者のための音楽) <https://youtu.be/oYA8p0M0trY?t=3259>  
 (京大おもしろトーク) <http://ocw.kyoto-u.ac.jp/ja/ocwcourse/149/video04>  
 (メンタルヘルス) [https://www.youtube.com/watch?v=h5U7cT\\_vq1s](https://www.youtube.com/watch?v=h5U7cT_vq1s)  
 (京大デザインスクール) [https://www.youtube.com/watch?v=\\_xxZWaoax2Q](https://www.youtube.com/watch?v=_xxZWaoax2Q)  
 (異分野交流会) <https://www.youtube.com/watch?v=GbE5k6dRzQ0&t=3746s>

## QOL (quality of life) designing for Medical Technology

Naohide Tomita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduated school of Engineering, Kyoto University

Tel: +81-75-383-3639, Fax: +81-75-383-3642, E-mail: [tomita.naohide.5c@kyoto-u.ac.jp](mailto:tomita.naohide.5c@kyoto-u.ac.jp)

## リン酸オクタカルシウムが破骨細胞－骨芽細胞間クロストークに与える効果

<sup>1</sup> 東北大学大学院歯学研究科 顎口腔機能創建学分野, <sup>2</sup> 東北大学大学院歯学研究科 歯学イノベーションリサーチセンター, <sup>3</sup> 東北大学大学院歯学研究科 口腔システム補綴学分野  
○鈴木 治<sup>1</sup>, 塩飽 由香利<sup>1,2</sup>, 土屋 香織<sup>1</sup>, 肖 凌浩<sup>1,3</sup>, 佐々木 啓一<sup>3</sup>

### 【緒言】

腫瘍、唇顎口蓋裂、歯周病などに伴う広範な骨欠損の修復を図る上で、優れた骨再生能を有する人工骨の創製が求められている。しかし、リン酸カルシウム系人工骨補填材であるハイドロキシアパタイト (HA) やβ-リン酸三カルシウム (β-TCP) は、その骨再生能が未だ自家骨には及ばないのが現状である。

そこで、人工骨の骨再生能を向上させる一つのアプローチとして、破骨細胞による骨形成促進に着目した。近年、破骨細胞は様々なサイトカイン (カップリング因子) の分泌を介して、骨芽細胞分化を調節していることが明らかとなってきた。先行研究において、非吸収性 HA 及び吸収性β-TCP 上における破骨細胞-骨芽細胞間クロストークについて解析した<sup>1</sup>。β-TCP では HA に比べ破骨細胞分化が促進され、カップリング因子 SPHK1, Cthrc1 の発現が上昇した。さらに、β-TCP から回収した破骨細胞培養上清は骨芽細胞分化を促進した。このことから、バイオマテリアル上の破骨細胞から分泌されたカップリング因子が骨再生に貢献している可能性が示唆された。

本研究では、優れた骨再生能を示し、吸収性の高いセラミックスであるリン酸八 (オクタ) カルシウム (OCP) に着目した<sup>2</sup>。OCP は HA の前駆物質であり、HA へと転換する過程でカルシウムイオンを取り込み、リン酸イオンを放出する。OCP 特有の転換挙動は、1) 骨芽細胞の初期分化を促進すること<sup>3</sup>、2) 骨髄細胞と骨芽細胞の共培養系において、破骨細胞形成を促すこと<sup>4</sup>が明らかとなっている。このように OCP は骨周囲の細胞活性を高めることから、OCP の材料化学的性質が破骨細胞-骨芽細胞間クロストークに与える影響について検討した。

### 【実験】

OCP 及び HA 粉末を金型に充填し、一軸加圧成形にて直径 15 mm のディスクを作製した。OCP, HA ディスク上にマウス骨髄マクロファージを播種し、RANKL 存在下にて破骨細胞形成を促進させた。TRAP 染色及びリアルタイム PCR にて、OCP, HA 上における破骨細胞分化能とカップリング因子の発現について検討した。また、破骨細胞培養液中におけるカルシウムイオン、及びリン酸イオンの継時的濃度変化を比色法にて定量した。さらに、培養前後の OCP, HA の結晶構造変化を X 線回折 (XRD) にて評価した。

### 【結果と考察】

OCP では HA に比べ破骨細胞形成が促進され、カップリング因子の発現を変化させた。OCP 上から回収した破骨細胞培養上清はリン酸の濃度が高い傾向を示した。また、結晶構造については OCP から HA へと転換する傾向が認められた。OCP の転換挙動が破骨細胞-骨芽細胞間クロストークに影響を与えている可能性が示唆された。

### 【参考文献】

1. Shiwaku Y et al. PLoS One 2015;20:10:e0132903.
2. Suzuki O et al. Biomaterials 2006;27:2671-2681.
3. Anada et al. Tissue Eng Part A 2008;14:965-978.
4. Takamai M et al. Tissue Eng Part A 2009;5:3991-4000.

### Effect of octacalcium phosphate on the osteoclast-osteoblast crosstalk

Osamu Suzuki<sup>1</sup>, Yukari Shiwaku<sup>1,2</sup>, Kaori Tsuchiya<sup>1</sup>, Linghao Xiao<sup>3</sup>, Keiichi Sasaki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Division of Craniofacial Function Engineering, Tohoku University Graduate School of Dentistry <sup>2</sup>Liaison Center for Innovative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry <sup>3</sup>Division of Advanced Prosthetic Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

E-mail: suzuki-o@m.tohoku.ac.jp

## 生体吸収性マグネシウム合金の分解に伴う空孔形成挙動評価手法開発

<sup>1</sup>物質・材料研究機構機能性材料研究拠点 <sup>2</sup>ワルシャワ工科大材料科学工学科  
 ○<sup>1</sup>山本玲子, <sup>1</sup>菊田明美, <sup>2</sup>Fillip Witkowski, <sup>2</sup>Wojciech Świąszkowski

【緒言】近年、生体内で分解し吸収される金属材料として Mg 合金の適用が進められている。既に、欧州では冠動脈ステント及び外反拇指矯正用中空スクリューが実用化されている。しかし、生体吸収性高分子・セラミックス材料とは分解機構が異なるため、従来の評価法や承認基準の適用は不可であり、適切な評価データを得るための手法や基準の整備が急務である。

Mg 合金は、体液中の水と反応、水素を発生し分解する。そのため、デバイス周辺組織における空孔形成が報告されている (C. Plaass et al. 2016)。組織中空孔形成は、当該部位の血流障害等を招き、損傷組織の治癒・回復に悪影響を及ぼすと推測され、空孔が大きいほど組織障害を引き起こしやすいと考えられる。外反拇指用スクリューでは、埋入後 3 か月以内という早期に固定部が崩壊したケースが 7 例あった (C. Plaass et al. 2016)。

組織中の空孔形成は、埋入部位における Mg 合金の分解による水素発生量と、発生した水素の拡散速度のバランスに依存する。これまでの *in vitro* および *in vivo* 試験結果から、分解速度および拡散速度には、埋入部位の血流が影響すると推測される (E. Zhang et al, 2009)。すなわち Mg 合金製デバイスにより空孔形成が生じるか否かは、埋入部位だけでなく動物—ヒト間の種差でも、さらには患者ごとに異なる可能性がある。前術のスクリューにおいても当然臨床前に動物埋植試験を実施しているが、それでも実際の臨床例において高率で空孔形成が確認されたことは、動物埋植試験では空孔形成リスクが十分に評価できていないことを示している。

Mg 合金製デバイスによる障害を避け、治療上のメリットを活用するためには、臨床前に空孔形成リスクを適切に評価することが必須である。そこで、本研究では Mg 合金による空孔形成リスクの適切な評価を目的とし、*in vitro* における空孔形成挙動観察手法の開発を行った。

【実験】試料として 3mmφ×5mm の純 Mg (99.9%) を使用した。全面を湿式研磨後、EOG により滅菌した。疑似体液としては、ヒト血漿組成に基づき開発された Eagle 最小必須培地 (E-MEM) を採用し、牛胎児血清を 10% 添加して用いた。ヒト組織におけるガス拡散障害を模擬するために、培地に種々の濃度の増粘剤を添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で浸漬試験を実施した。一定期間経過後の空孔形成量をマイクロ X 線 CT 観察により求めた。対象として増粘剤を添加しない培地中への浸漬も実施し、溶液中に溶出した Mg イオンを定量した。浸漬試験終了後、試料を回収し、クロム酸洗浄後の重量減から、分解量を求めた。

【結果と考察】疑似体液中の浸漬試験では、Mg 試料の分解により発生した水素は、しばらく試料に吸着した泡の状態に留まるが、泡が大きくなるにつれ試料から脱離し、液面に向けて上昇していく。一方、疑似体液中に増粘剤を添加することによって、疑似体液はゲルを形成し、浸漬時間の経過に伴い空孔の形成が観察された。

増粘剤濃度に依存して、疑似体液中の拡散速度は低下すると予想される。組織中の空孔形成は、水素発生量と拡散速度のバランスに依存するため、模擬組織中の拡散速度が低下すると、空孔形成量は増えると推測される。純 Mg 試料の浸漬試験の結果、増粘剤濃度が高いほど、空孔形成量が増加する傾向が認められた。一方、浸漬終了後の重量減から、増粘剤濃度が高い程、分解量が増加することも確認された。浸漬後の試料の概観観察より、増粘剤添加により局部腐食の発生が増加していることが確認された。今後、*in vivo* および臨床データとの相関性を検討することにより、空孔形成リスクの評価法確立に貢献することが期待される。

### Development of the evaluation method for gas cavity formation accompanying degradation of Mg alloy

Akiko Yamamoto<sup>1</sup>, Akemi Kikuta<sup>1</sup>, Fillip Witkowski<sup>2</sup>, and Wojciech Świąszkowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Sciences, <sup>2</sup>Faculty of Materials Science and Engineering, Warsaw University of Technology

Tel: +81-29-860-4169, Fax: +81-29-860-4626, E-mail: [yamamoto.akiko@nims.go.jp](mailto:yamamoto.akiko@nims.go.jp)

## 気孔径が炭酸アパタイトハニカムの骨伝導性に及ぼす影響

<sup>1</sup>九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野, <sup>2</sup>福岡歯科大学生体工学分野, <sup>3</sup>産総研四国センター  
○石川 邦夫<sup>1</sup>, 林 幸彦<sup>1</sup>, 土谷 享<sup>1</sup>, 都留 寛治<sup>1,2</sup>, 杉浦 悠紀<sup>1,3</sup>

### 【緒言】

骨組成は炭酸アパタイトであるが、炭酸アパタイトは焼結操作によって熱分解を受けるため、1970年代から水酸アパタイトが人工骨補填材として臨床応用されている。水酸アパタイトは骨伝導性を示すものの自家骨と比較すると骨伝導性に劣り、自家骨と異なり骨に置換されない。我々は前駆体を用いた溶解析出反応で炭酸アパタイトブロックが調製できることを見出した。炭酸アパタイトブロックは、水酸アパタイトに比較して圧倒的に高い骨伝導性を示す。また、炭酸アパタイトブロックは自家骨と同様に骨リモデリングを受け骨に置換される。炭酸アパタイトブロックは細胞による骨リモデリングで骨に置換されるため、連通多孔体化することによって置換速度が加速される。ハニカム構造は理想的な連通多孔体の一つであるが、その気孔径が骨伝導等に及ぼす影響は知られていない。また、組織侵入には300-600 $\mu$ mの気孔径が好ましいと言われているが、炭酸アパタイトにおける最適気孔径は知られていない。そこで本研究においては、気孔径の異なる炭酸アパタイトハニカムを調製し、気孔径が炭酸アパタイトの骨伝導性に及ぼす影響を検討した。

### 【実験】

水酸化カルシウム粉末をワックス系バインダーと混練し、ハニカム金型をつけた押出成形装置で押し出し、水酸化カルシウムハニカムを調製した。水酸化カルシウムハニカムを脱脂、炭酸化し、炭酸カルシウムハニカムを調製し、リン酸化して炭酸アパタイトハニカムを調製した。なお、ハニカム金型を変更することによって気孔径が100 $\mu$ m、125 $\mu$ m、150 $\mu$ mの炭酸アパタイトハニカムを調製した。

家兔脛骨に $\phi$ 7mmの骨欠損を調製し、850-1000 $\mu$ mの炭酸アパタイトハニカムおよび炭酸アパタイト緻密体で骨欠損部を再建し、埋入2週および4週目に試料を周囲組織と一塊に摘出、HE染色像を検索した。

### 【結果と考察】

ハニカム金型から押し出された水酸化カルシウム粉末含有ワックス系バインダーハニカムを脱脂炭酸化すると炭酸カルシウムハニカムとなったことが、粉末XRD回折、SEM観察から確認された。該炭酸カルシウムハニカムをリン酸ナトリウム水溶液に浸漬すると炭酸カルシウムハニカムのマクロ形態を保ったまま組成が炭酸アパタイトに変換されたことが粉末XRD回折、FT-IR分析、SEM観察から確認された。なお、炭酸カルシウムハニカムと炭酸アパタイトハニカムのミクロ形態は異なっており、溶解析出反応で保持できるのはマクロ形態のみであることが確認された。

炭酸アパタイトハニカム顆粒および炭酸アパタイト緻密体顆粒を家兔脛骨欠損部に埋入した場合、全ての試料で顕著な炎症反応は確認されず、優れた組織親和性を示すことが確認された。埋入2週目の段階で緻密体顆粒およびハニカム顆粒の両者への骨伝導が確認された。緻密体顆粒内部へは組織侵入が確認されなかった、ハニカム顆粒は気孔内部への骨伝導が確認された。

埋入4週目の段階で緻密体顆粒の場合も一部の骨組織が顆粒内部に伝導している所見が確認された。ハニカム顆粒の場合には顆粒内部への骨伝導が顕著であった。

骨形成量は気孔径が100 $\mu$ mの炭酸アパタイトハニカム顆粒が他のハニカム顆粒に比較して優位に多かった。

この結果から、炭酸アパタイトの場合は気孔が100 $\mu$ mであっても組織侵入が旺盛であること、気孔径が小さい方が、骨伝導量が多くなる可能性が示唆された。

### Effects of Pore Size on Osteoconductivity of Carbonate Apatite Honeycomb

Kunio Ishikawa<sup>1</sup>, Koichiro Hayashi<sup>1</sup>, Akira Tuchiya<sup>2</sup>, Kanji Tsuru<sup>1,2</sup>, Yuki Sugiura<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomaterials, Faculty of Dental Science, Kyushu University, <sup>2</sup>Department of Dental Engineering, Fukuoka College of Dentistry, <sup>3</sup>Shikoku Center, AIST.

Tel: +81-92-642-6344, Fax: +81-92-642-6348, E-mail: ishikawa@dent.kyushu-u.ac.jp

## The enhanced osseointegration of a novel implant antibacterial coating

Jiang Wu<sup>1,2</sup>, Huifang Ren<sup>1</sup>, Yicheng Cheng<sup>1</sup><sup>1</sup> School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, China<sup>2</sup> Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan

**【Introduction】** Titanium implants are widely used in the dental area for the excellent biocompatibility and biomechanical properties. Despite the follow-up studies have indicated that 10-year success rate is 90%-95%, the cases with failed implants still happen. Studies showed that bacterial biofilm on the implant surface are the main cause of early postoperative infection, and may lead eventually to implant treatment failure. The current research mainly focuses on constructing novel titanium implants coating with antibacterial characters, which can inhibit early bacterial adhesion and improve the osseointegration for postoperative infection. In recent years, halogenated furanone compounds attract much attention for the following characters: 1). widely antibacterial spectrum, 2). effectively inhibit the bacterial biofilm formation and bacterial drug-resistance, 3). biological compatibility, 4). no genetic toxicity and cell toxicity. In view of this, our current research is to fabricate a novel antibacterial coating containing halogenated furanone-loaded poly(L-lactic acid) (PLLA) nanoparticles (NPs) on microarc-oxidized titanium and evaluate its osseointegration character for postoperative infection in vivo.

**【Experiments】** (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone (BBF) loaded PLLA-NPs were prepared using the oil-in-water emulsion solvent-evaporation method with optimal preparation technology. 24 smooth cylindrical commercial pure Ti implants (3.5×10mm) were prepared and micro-arc oxidation (MAO) treated. Then, 400 μL suspensions containing 20 mg of BBF-PLLA-NPs was dropped onto 8 randomized selected MAO Ti implants and then oscillated. Finally, the novel antibacterial coating was achieved by cross-linking the nanoparticles with gelatin on the implant surface. Thereafter, 24 implants were divided as 3 groups and implanted in the mandible of Beagle dogs. The postoperative infection was induced through silk ligation and high sugar diet. Implants treated with minocycline hydrochloride ointment (once a week after implantation) were set as positive control and non-treatment implants were blank control. After 2 months, the clinical measurements including Probing depth (PD), peri-implant sulcular fluid (PISF) and the mobility of implants (MOI) was measured. Moreover, bone-implant interface and pull-out tests were carried out, respectively.

**【Results】** After 2-month implantation, the clinical measurements of the blank control group were significantly higher than those of the other two groups ( $P<0.05$ ), but no significant differences were detected between the experimental and positive control groups ( $P>0.05$ ). For blank control group, the bone-implant contact rate and ultimate interfacial strength were significantly lower than those of the other two groups ( $P<0.05$ ). Scanning electron microscope observation and histological examination showed that more new bone was formed on the surface of the experimental and positive control groups. It can be concluded that the antibacterial coating fabricated on implants has remarkable preventive effect on peri-implant infection at the early stage.

---

Jiang Wu<sup>1,2</sup>, Huifang Ren<sup>1</sup>, Yicheng Cheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, China

<sup>2</sup> Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan

Tel: +81-82-257-5648, Fax: +81-82-257-5649, E-mail: [wujiang@fmmu.edu.cn](mailto:wujiang@fmmu.edu.cn)

## Management of Tumorigenic Potential of Triple Negative Breast Cancer by Nitroxide Radical-containing Nanoparticles

<sup>1</sup>Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan, <sup>2</sup>Master's School of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

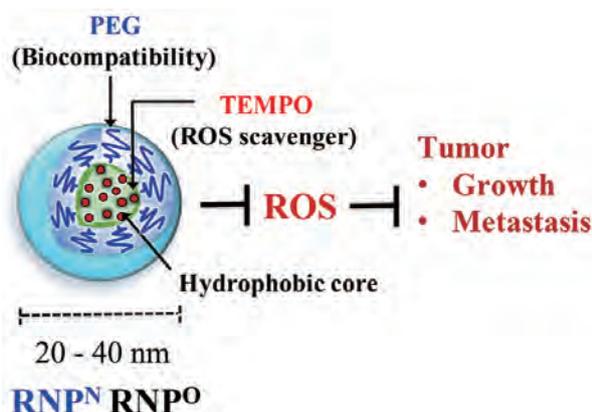
○Babita Shashni<sup>1</sup> and Yukio Nagasaki<sup>1,2</sup>

### 【INTRODUCTION】

Sustained elevated intracellular reactive oxygen species (ROS), requisite for cancerous phenotypes, has been known to affect cancers in a positive feedback manner, by playing critical roles in survival, proliferation and metastasis processes. Hence, scavenging of ROS to abrogate cell survival signaling pathways may therefore offer a potential therapeutic approach to attenuate the progression of various cancers. In this line, we therefore synthesized ROS scavenging nitroxide radical-containing nanoparticles (RNPs); pH insensitive RNP<sup>O</sup> and pH sensitive RNP<sup>N</sup>, to impede the proliferative and metastatic characteristics of the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-231, both *in vitro* and *in vivo* (Figure 1).

### 【METHODOLOGY】

RNP<sup>O</sup> and RNP<sup>N</sup> were prepared by self-assembly of block copolymers, MeO-PEG-*b*-PMOT and MeO-PEG-*b*-PMNT, respectively, by dialyzing polymers against water. Inhibition on MDA-MB-231 cell growth and migration was confirmed by MTT dye reduction assay, colony forming assay, and trans-well migration and invasion assay, respectively. Anti-tumor and anti-metastatic potential of RNPs were confirmed in an MDA-MB-231 xenograft mouse model.



**Figure 1.** Graphical abstract

### 【RESULT and DISCUSSION】

RNPs significantly inhibited proliferation, colony forming potential, migration and invasion of MDA-MB-231 cells, accompanied by decrease in ROS level. Furthermore, anti-tumor and anti-metastatic potential of RNPs was observed in an MDA-MB-231 xenograft mouse model via downregulation of ROS-sensitive transcriptional factor, NF-κB and migration regulator, MMP-2 with negligible adverse effect compared to low molecular weight TEMPOL and paclitaxel. Conclusively, our findings provide insights into the use of nanoparticle over low molecular weight antioxidants in the redox-based cancer therapeutics.

## Management of Tumorigenic Potential of Triple Negative Breast Cancer by Nitroxide Radical-containing Nanoparticles

○Babita Shashni<sup>1</sup> and Yukio Nagasaki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

<sup>2</sup>Master's School of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

Tel: +81-029-853-5936 Fax: +81-029-853-5749

E-mail: shashni@ims.tsukuba.ac.jp, happyhusband@nagalabo.jp

## リポソーム内部におけるポリマー合成による機能性カプセルの開発

慶應義塾大学大学院 理工学研究科  
○杉本 光, 福井 有香, 藤本 啓二

【緒言】リポソームは生体膜由来のカプセル素材であり、われわれは新規の物性と機能を付与するために表面改質として、ポリマーの吸着、結合、グラフト化などを行ってきた。このような表面改質によって、膜安定性、物質保持能、環境応答性などの機能を発現させることができる。本研究では、リポソーム内部を反応場と捉え、重合反応を行うことによって内部環境と構造の創出、さらに物性と機能の発現を目指した。モノマーを内封したリポソームの内部においてポリマーを生成させ、膜物性と構造、物質の保持性、環境応答性など物性の発現と、それに伴う物質の吸収・放出など機能の発現を試みた。

【実験】 粒径約 1000 nm のリポソーム内にモノマーである 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA)、架橋剤の *N,N*-Methylenebisacrylamide (MBAAm) および光重合開始剤 (Irgacure2959) を封入し、UV 照射 (高圧水銀灯, 400 W) による光重合を行った。HEMA ポリマー (PHEMA) を内封したカプセル (H-Lipo) について、水中粒径測定と透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態観察を行った。さらに、有機酸 Ibuprofen sodium salt (IBUNa) によって、リポソーム内部における PHEMA の溶解を検討した。さらに、物質担持能を付与するために、カチオン性モノマーの *N*-(3-Aminopropyl)methacrylamide hydrochloride (APMA) と HEMA の共重合を行った。この共重合ポリマー内封カプセル (A-H-Lipo) について、赤外吸収スペクトル (FT-IR) 測定による組成評価、水中粒径測定、TEM 観察などを行った。A-H-Lipo の分散液 (10 mM, pH 7.4) を遠心分離した後に、アニオン性蛍光物質の Fluorescein 溶液 (10 mM, pH 7.4) を加え、吸収・保持挙動を検討した。続いて、種々の pH、イオン強度および温度において、Fluorescein の放出挙動を検討した。

【結果と考察】 H-Lipo の作製において、仕込みの HEMA 濃度とともに封入量が増大し、開始剤濃度によって転化率を調節できた。TEM 観察より、HEMA のみの重合では内部全体にポリマーが生成して白濁が見られた。一方、HEMA : MBAAm = 370 : 30 の比率で重合を行ったものでは、内部に粒子の生成が観察された。水中粒径を測定したところ、リポソームに由来する 1000 nm 付近のピークに加え 200 nm 付近にピークが観察された。このカプセルに IBUNa を添加すると 200 nm 付近のピークが消失し、続いて透析を行ったところ、再び 200 nm 付近にピークが観察された。これは PHEMA 粒子の膨潤によるものと考えられ、IBUNa によってカプセル内部の環境および物質の保持性を変化させることが期待できる。次に、A-H-Lipo の作製において、FT-IR 測定から APMA と HEMA の重合を確認することができた。TEM 観察より、架橋剤の有無によらず Lipo 内部に粒子は見られず、内部全体が白濁している様子が見られた。また、APMA の濃度を増大させて重合すると界面活性剤に対する耐性が向上することがわかった。これは、PAPMA が Lipo の内壁に吸着し安定化に寄与したためだと考えている。次に、Fluorescein の吸収を行ったところ、リポソームと H-Lipo と比べて A-H-Lipo は高い吸収性を示し、PAPMA 含率とともに吸収量が増大することがわかった。さらに、Fluorescein を封入させた A-H-Lipo では、pH 7.4 から pH 9.0 に環境を変化させると、放出の促進が見られた。おそらく、PAPMA ( $pK_a=8.3$ ) の荷電状態が pH によって変化し、Fluorescein の保持性が変化して放出に至ったと考えている。また、イオン強度によっても同様に放出を調節することができた。このように内部にポリマーを生成させたカプセルは、環境によって物質の吸収性と保持性が変化するため、過剰な物質の回収、薬物の体内輸送などへの応用が期待できる。

---

**Creation of Functional Capsules by Polymer Synthesis inside a Liposome**

Hikaru SUGIMOTO, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO

Graduate School of Science and Technology, Keio University

Tel: 045-566-1580, Fax: 045-566-1551, E-mail: fujimoto@applic.keio.ac.jp

## コレステロール修飾相補鎖 RNA を用いた mRNA 搭載高分子ミセル安定化

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>川崎市産業振興財団, ナノ医療イノベーションセンター (iCONM),  
<sup>3</sup>東京医科歯科大学, <sup>4</sup>東京大学政策ビジョン研究センター

○内田 智士<sup>1,2</sup>, 吉永 直人<sup>1,2</sup>, 長田 健介<sup>1</sup>, 位高 啓史<sup>3</sup>, Horacio Cabral<sup>1</sup>, 片岡 一則<sup>1,4</sup>

【緒言】 メッセンジャー(m)RNA 医薬の輸送担体の開発において、主に輸送担体を構成する高分子や脂質に着目した研究が行われてきた。一方で、mRNA に着目すると、軽微な化学修飾によりその翻訳活性が大きく低下するため、自由な機能修飾は困難であった。そこで、機能性官能基を修飾した相補鎖 RNA オリゴマーを mRNA にハイブリダイズすることで、mRNA の翻訳活性を維持したまま、mRNA の化学修飾をできないかと着想した。以前、5' 末端にトリリン酸化構造を有する 120 塩基のポリ U 鎖を mRNA のポリ A 部分に結合させることで、翻訳活性を維持したまま mRNA の免疫賦活化作用を向上させ、mRNA ワクチンの機能向上に成功した [*Biomaterials* 150:162-170 (2018)]。今回、17 塩基の相補鎖 RNA を mRNA への直接化学修飾 5'トリリン酸化ポリUの結合 化学修飾17nt RNAの結合 結合させても、その結合部位によらず mRNA の翻訳活性や免疫原性に影響しないことを見出し、この相補鎖 RNA を mRNA 輸送担体設計に応用した。具体的には、コレステロール (Chol) 修飾 mRNA を用い、高分子ミセルを安定化させた。

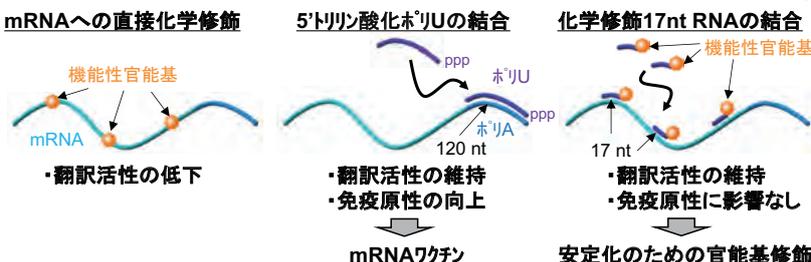


図 化学修飾相補鎖RNAを用いたmRNAの機能化

【実験】 *Gussia luciferase* (Luc) 発現 mRNA に、5' 末端 Chol 基修飾相補鎖 RNA (Chol-RNA) を 1~9 個結合させた。それを ω 末端に Chol 基を有するポリエチレングリコール-ポリカチオン、ブロック共重合体と混合させることで、mRNA 搭載高分子ミセルを調製し、以下の解析に用いた。

【結果と考察】 mRNA への Chol-RNA の結合の有無によらず、約 60nm の電気的にはほぼ中性な粒子の形成が確認され、コアに mRNA を内包したミセルの形成が示唆された。二重蛍光標識 mRNA 搭載ミセルの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 測定では、mRNA とブロック共重合体の両方への Chol 基修飾により FRET 効率が上昇し、ミセルコアでの mRNA のより強い凝縮が示唆された。一方で、mRNA とブロック共重合体の片方のみへの Chol 基修飾では、凝縮状態は変化しなかったため、mRNA 上とブロック共重合体上の Chol 基の相互作用が、mRNA 凝縮に重要であることが示唆された。

血清中での酵素分解耐性試験では、mRNA とブロック共重合体の両方への Chol 基修飾により、Chol-RNA 数に依存して酵素耐性が向上し、Chol 未修飾の高分子ミセルと比較して、最大で血清培養後の mRNA 残存量が 10 倍以上向上した。また、デキストラン硫酸に対する mRNA の置き換わり耐性試験では、mRNA とブロック共重合体の両方への Chol 基修飾により、ミセルからの mRNA 放出が大きく抑制された。さらに、培養細胞に Luc mRNA を導入したところ、Chol-RNA の結合により Luc 発現効率が向上した。以上のような Chol-RNA 結合による効果は、mRNA 上の Chol-RNA 結合部位によらず観察された。Chol-RNA に起因する細胞毒性や炎症性変化は観察されず、また内因性遺伝子に相補的な配列の Chol-RNA を導入しても、内因性遺伝子発現にほとんど影響しなかったことから、安全性は担保された。最後に、マウス肺へ経気道的に導入することで、生体内での機能の評価したところ、Chol-RNA を用いることで肺での Luc 発現効率が 3 倍程度向上した。

Chol-RNA を用いた高分子ミセル安定性の飛躍的な向上に成功した。今後、本基盤技術を用い、mRNA に様々な官能基を修飾することで、様々な輸送担体の機能を向上できることが期待される。

### Stabilization of mRNA polyplex micelles using cholesterol-installed complementary RNA

Satoshi Uchida<sup>1,2</sup>, Naoto Yoshinaga<sup>1,2</sup>, Kensuke Osada<sup>1</sup>, Keiji Itaka<sup>3</sup>, Horacio Cabral<sup>1</sup>, Kazunori Kataoka<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, The University of Tokyo <sup>2</sup>Kawasaki Institute of Industrial Promotion

<sup>3</sup>Tokyo Medical and Dental University <sup>4</sup>Policy Alternatives Research Institute, The University of Tokyo

Tel: +81-3-5841-7138, Fax: +81-3-5841-7139, E-mail: [suchida@bmw.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:suchida@bmw.t.u-tokyo.ac.jp)

## 生体膜ハイブリッドナノ粒子の構築とバイオ機能評価

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻

○名倉 百華・澤田 晋一・佐々木 善浩・秋吉 一成

【緒言】エクソソームやウイルスなど生体由来のナノ粒子に加え、リポソームやシリカナノ粒子などの人工的に作製されたナノ粒子が開発され、薬物輸送キャリアなどをはじめとする機能性ナノ粒子としての研究が盛んに行われている。また近年、この生体由来ナノ粒子と人工ナノ粒子を融合することで得られる機能性ハイブリッドナノ粒子の開発にも注目が集まっている。例えば、生体膜成分を機能性ナノ粒子に被覆したハイブリッドナノ粒子はその膜に発現している糖鎖や膜タンパク質により、機能性ナノ粒子単独では困難な優れた生体適合性や免疫細胞から逃れるステルス機能などを発現することが知られている。

このような背景のもと、本研究では遠心力を用いることでシリカナノ粒子と生体膜から構成されるハイブリッドを簡便かつ効率的に作製する手法を見出し、得られたハイブリッドナノ粒子の薬物送達キャリアをはじめとするバイオマテリアルとしての機能評価を行った。(Fig. 1)

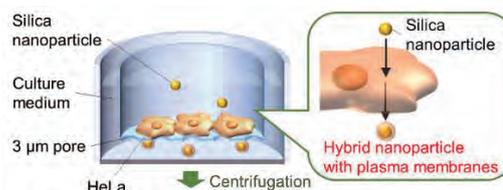


Figure 1. Production of hybrid nanoparticle with plasma membranes via centrifugation

【実験】蛍光標識されたシリカナノ粒子（コアフロント社製 100 nm, 300 nm）について、動的光散乱測定（DLS）による粒径測定と透過型電子顕微鏡による形態観察を行った。次に、多孔性基板（セルカルチャーインサート、ポアサイズ 3  $\mu\text{m}$ ）上にヒト子宮頸がん細胞（HeLa 細胞）を播種、24 時間培養後、蛍光標識されたシリカナノ粒子を添加し、3000 g で 30 分遠心操作を行った。遠心後の培養容器下層の溶液を回収し、その蛍光測定を行うことでシリカナノ粒子の細胞膜透過率を算出した。また、遠心操作後の細胞生存率を評価した。最後に、本手法によって得られたハイブリッド微粒子上に細胞由来の膜タンパク質が担持されているかどうかをウェスタンブロット法により評価した。(Fig. 2)

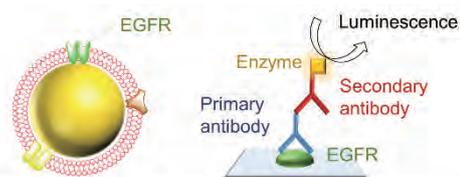


Figure 2. Schematic illustration of western blotting and detection of EGFR on the hybrid nanoparticles.

【結果と考察】今回用いたいずれのシリカナノ粒子も球状の構造をとっており、極めて単分散であることが DLS 測定などから示された。また、これらシリカナノ粒子の細胞透過率を評価したところ、300 nm のシリカでは 20 % 程度、100 nm のシリカで 50 % 程度が遠心力により細胞膜を透過していることが明らかとなった。この条件下、遠心操作後の細胞生存率を評価したところ、ナノ粒子による顕著な細胞障害性は見られないことがわかった。さらに、ウェスタンブロットの結果から、HeLa 細胞上に発現している膜タンパク質（EGFR）が、細胞膜を透過した微粒子上に確かに存在していることが明らかとなった。膜タンパク質はその極めて高い疎水性から水に不溶であり、シリカ表面は極めて親水的であることから、この結果は生体膜をともなった膜タンパク質が微粒子上に担持されていることを示しているものと解釈される。

以上の結果から、細胞に対してシリカ粒子を添加し、遠心操作を行うことで、新規生体膜ハイブリッドを簡便かつ効率的に作製する手法を見出した。本手法は短時間で細胞非侵襲に膜タンパク質を抽出することが可能であり、薬物ナノキャリアとしてだけでなく、細胞膜情報を経時的に抽出、解析する新規手法などとしての展開が期待される。

### Preparation of hybrid nanoparticles with biomembrane for potential biomedical application

Momoka NAKURA, Shin-ichi SAWADA, Yoshihiro SASAKI, Kazunari AKIYOSHI

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Tel: +81-075-383-2589, Fax: +81-075-383-2590, E-mail: nakura.momoka.35x@st.kyoto-u.ac.jp

## 生体接着型オプトエレクトロニクスによる局所光線力学療法

<sup>1</sup>早稲田大学高等研究所, <sup>2</sup>JST さきがけ, <sup>3</sup>早稲田大学大学院先進理工学研究科, <sup>4</sup>京都大学大学院医学研究科, <sup>5</sup>東京大学大学院医学系研究科, <sup>6</sup>防衛医科大学校生理学講座  
○藤枝 俊宣<sup>1,2</sup>, 山岸 健人<sup>3</sup>, 桐野 泉<sup>4</sup>, 高橋 功<sup>3</sup>, 天野 日出<sup>5</sup>, 武岡 真司<sup>3</sup>, 守本 祐司<sup>6</sup>

【緒言】光線力学療法(PDT)は、光増感剤が集積した腫瘍に光を照射することにより発生する活性酸素を利用して、がんの細胞死を誘導する治療方法である。既に保険収載されている治療方法ではあるものの、腫瘍と光源の位置が少しでもずれると治療効果が得られないため、生体内の臓器や組織表面に長期間光源を安定に固定できる発光システムの開発が望まれている。本研究では、polydimethyl siloxane (PDMS)からなる高分子ナノ薄膜に生体模倣型の接着性高分子である polydopamine (PDA)を修飾することで、生体内にシールのように貼付可能な組織接着性ナノ薄膜を開発した[1]。このナノ薄膜を用いて無線給電式の発光ダイオード(LED)を封止し、担がんモデルマウスの皮下に発光源を設置することで、埋め込み型デバイスによる PDT を実現したので報告する。

【実験】グラビアコーターを用いて、PET フィルム上に水溶性犠牲層となる polyvinyl alcohol (PVA) を製膜した。次に、PDMS (base:cure=10:1)を希釈後、PVA 層の上に製膜して熱硬化させた(80°C, 12 h)。PVA/PDMS 二層膜を PET フィルムから剥離し、水中にて PVA 層を溶解することで自己支持性 PDMS ナノ薄膜を得た。この PDMS ナノ薄膜をドーパミン溶液(2 mg/mL in 10 mM Tris buffer, pH8.5, O<sub>2</sub> bubbling, 24 h)に浸漬することで PDA をナノ薄膜表面に修飾した。この時、得られたナノ薄膜の接着エネルギーを引張試験機を利用したタックセパレーション試験にて評価した。さらに、PDA 修飾した PDMS ナノ薄膜(膜厚約 650 nm)を用いて、近距離無線(NFC)発光式の赤色および緑色の LED チップ(7.0×11.0×0.8 mm, <100 μW/cm<sup>2</sup>)をサンドウィッチ状に封止し、生体組織への接着性を有する発光デバイスを作製した。背部皮下に腫瘍細胞を移植した担がんモデルマウスを作製し、PDA 修飾 PDMS ナノ薄膜の接着性を利用して発光デバイスを皮下に貼付した。光増感剤投与下(Photofrin, 8 mg/kg, 2 回)において、腫瘍に対して 10 日間連続で光照射した際の腫瘍サイズの変化を経時的に測定し、14 日後における病巣部の組織切片像より治療後の腫瘍形態を評価した。

【結果と考察】自己支持性 PDMS ナノ薄膜(膜厚約 560 nm, ヤング率約 1.47 MPa)の接着力を、タックセパレーション試験法にて評価した。ナノ薄膜が生体組織(例: 鶏肉筋層)から剥離するまでに要する仕事量を接着エネルギー(μJ/cm<sup>2</sup>)として算出したところ、PDMS ナノ薄膜(膜厚: 560 nm)では 10.5 μJ/cm<sup>2</sup>であったのに対して、PDA 修飾体(膜厚: 650 nm)では約 5 倍の 50.7 μJ/cm<sup>2</sup>であり、0.8 mm 厚の PDMS 膜に対しては 25 倍の接着性を示した。

次に、PDA 修飾 PDMS ナノ薄膜(膜厚約 650 nm)にて封止した LED (赤・緑)を、担がんモデルマウスの皮下に貼付した(Fig. 1a, 2×2 cm<sup>2</sup>)。無線給電用アンテナをマウスケージ下に設置し、腫瘍に対して局所的・連続的な光照射を無線給電(13.56 MHz)にて実施した(Fig. 1b)。Photofrin を投与後 10 日間に亘り連続的に腫瘍に光を照射したところ、治療群では腫瘍サイズの増大を抑制することに成功した。興味深いことに、赤光源の場合には腫瘍 10 個中 1 個を、緑光源の場合には 10 個中 6 個を根治することに成功し、緑光源の場合には細胞死に特徴的な所見(核濃縮、細胞膜破壊)も認められた。

【文献】(1) Yamagishi, K. *et al. Nat. Biomed. Eng.*, in press (2018). DOI: 10.1038/s41551-018-0261-7

### Local Photodynamic Therapy by Bio-Adhesive Optoelectronics

Toshinori Fujie<sup>1,2</sup>, Kento Yamagishi<sup>3</sup>, Kirino Izumi<sup>4</sup>, Isao Takahashi<sup>3</sup>, Hizuru Amano<sup>5</sup>, Shinji Takeoka<sup>3</sup>, Yuji Morimoto<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Waseda Institute for Advanced Study, Waseda University, <sup>2</sup>Japan Science and Technology Agency, PRESTO, <sup>3</sup>Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, <sup>4</sup>Graduate School of Medicine, Kyoto University, <sup>5</sup>Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, <sup>6</sup>Department of Physiology, National Defense Medical College

Tel: +81-3-5369-7324, Fax: +81-3-5369-7324, E-mail: [t.fujie@aoni.waseda.jp](mailto:t.fujie@aoni.waseda.jp)

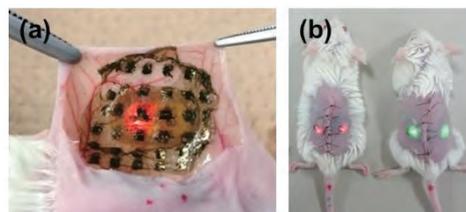


Figure 1. (a) A subcutaneously implanted LED device. i.e., Dots were printed for visualizing the nanosheet. (b) Wirelessly-powered red and green LEDs in mice (Reproduced from Ref. 1).

## ミトコンドリア強化幹細胞 (MITO Cell)を用いた細胞移植療法の検証

<sup>1</sup>北海道大学 大学院薬学研究院, <sup>2</sup>北海道大学病院 小児科  
○山田 勇磨<sup>1</sup>, 阿部 二郎<sup>2</sup>, 佐々木 大輔<sup>2</sup>, 武田 充人<sup>2</sup>, 原島 秀吉<sup>1</sup>

### 【緒言】

心不全は癌に次ぐ死因であり ACE 阻害薬や $\beta$ 遮断薬は限定的な有効性を示すが、心臓移植を除いて根本的な治療法は報告されていない。心筋幹細胞 (Cardiac Progenitor Cell [CP Cell]) 移植は、心筋症に対する治療法として大規模臨床試験において、その有用性が認められている。一方で、持続的な移植効果維持が困難とされており、移植細胞のミトコンドリア機能不全などが原因として報告されている。我々は、酸化ストレス発生源であり細胞内 ATP 産生を担うミトコンドリアを強化した心筋幹細胞 (MITO Cell) を移植に用いる事で、荒廃した心不全環境においても有効な心筋幹細胞移植が可能になると考えた。本研究では、酸化ストレス発生源であり細胞内 ATP 産生を担うミトコンドリアを強化した移植細胞 (MITO Cell) の製造および心筋症モデルを用いた細胞移植療法の検証を研究目的としました。

### 【実験】

MITO Cell の構築は、我々が開発を進めてきた Mt 標的型ナノカプセル、MITO-Porter を用いて CP Cell のミトコンドリアに抗酸化能・ミトコンドリア代謝能亢進能を有する機能性分子レスベラトロール (RES) を送達し構築した。次に、マウス心臓に MITO Cell を投与した後に、ミトコンドリア毒性を有するドキシソルビシンを腹腔投与し、継時的に生存率を評価した。さらに、細胞移植後の心臓組織の酸化ストレス状態を活性酸素マーカー・DHE 陽性細胞をカウントし評価、TUNEL 法を用いてアポトーシス陽性細胞をカウントしアポトーシス誘導率を算出した。また、ミトコンドリア機能を定量的逆転写 PCR 法を用いて、ミトコンドリア新生・ミトコンドリア呼吸鎖に関連する mRNA 発現量を定量評価、Blue-Native PAGE を用いて呼吸鎖複合体形成率を算出した。

### 【結果と考察】

ドキシソルビシン心筋症モデルマウスを用いた生存率試験の結果、従来法・CP Cell 移植群では 2 週間以内に全ての個体が死亡したが、MITO Cell 移植群では 1 か月後においても半数以上が生存していた。細胞移植後の心臓組織の酸化ストレス状態を評価した結果、MITO-Cell 移植群では DHE 陽性細胞の増加を抑制する傾向が観察された。また、TUNEL 法を用いた評価によって、MITO-Cell 移植群では健常マウス群と同程度のレベルまでアポトーシス誘導が抑制されている事を確認した。さらに、心筋組織のミトコンドリア機能を評価したところ、MITO Cell 移植群では健常マウス群と同程度のレベルまでミトコンドリア遺伝子発現が回復し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の保持する事を確認し、MITO Cell 移植群で有効な治療効果が観察された。本研究は、ミトコンドリアへの薬物送達が心筋幹細胞移植療法の成績向上に寄与する可能性を検証する世界初の試みである。

---

### Validation of cell transplant therapy using mitochondria-activated stem cells (MITO Cells)

Yuma Yamada<sup>1</sup>, Jiro Abe<sup>2</sup>, Daisuke Sasaki<sup>2</sup>, Atsuhito Takeda<sup>2</sup>, Hideyoshi Harashima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University <sup>2</sup> Department of Pediatrics, Hokkaido University Hospital

Tel: +81-11-706-3735, Fax: +81-11-706-3734, E-mail: [u-ma@pharm.hokudai.ac.jp](mailto:u-ma@pharm.hokudai.ac.jp)

## ペプチド修飾脱細胞小口径血管の組織再生プロセスと開存性

<sup>1</sup> 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部, <sup>2</sup> 関西大学 化学生命工学部  
○馬原 淳<sup>1</sup>, 古島 健太郎<sup>1, 2</sup>, 平野義明<sup>2</sup>, 山岡 哲二<sup>1</sup>

**【緒言】** 再生型人工血管は移植したマトリックスが自家血管へと置換されることで長期的な血管開存性が期待されるため、小口径人工血管への応用も検討されている。しかし大口径合成人工血管と同様に超早期（数分～数日）で起こる血栓形成を制御しなければその後の安定した血管開存や組織再生を実現できない。これまでに我々は、脱細胞化組織の内腔に REDV ペプチドを固定化した組織再生型の小口径人工血管を開発し、ミニブタへの移植により内径 2mm, 長さ 20-30cm の Long-bypass graft の開存と早期内皮化を報告した (Figure 1) [1]。この人工血管は、固定化した REDV ペプチドが移植初期での微小血栓付着の抑制と、循環する血管系前駆細胞の超早期（1日～3日）捕捉により、血栓形成を回避して安定した血管開存性を示す。一方、補足された内皮前駆系細胞の成熟化や、中膜組織の再生は、中・長期での血管開存性において重要であるが、その機序を詳細に解明した報告はない。そこで本発表では、ミニブタとヤギを用いた大動物への同所置換移植ならびにバイパス移植評価により、中・長期における内膜・中膜領域での組織再生プロセスについて評価した結果を報告する。さらに、2つの機序からなる内膜化形成の機序や、異所置換における再生型人工血管に対する Medication の重要性についても併せて議論する。



Figure 1. Peptide-modified small-diameter acellular graft

**【実験】** ダチョウの頸動脈を超高圧処理と DNase 処理により脱細胞化し、内径 2mm の小口径人工血管用脱細胞マトリックスを作製した。Pro-Hyp-Gly の繰り返し配列と、内皮細胞接着ドメインである Arg-Glu-Asp-Val 配列を結合させたペプチドを用いて、内腔に REDV ペプチドを固定化したものを使用した。中・有長期の組織再生を評価するために、ミニブタ、ヤギの大腿動脈、正中動脈に対する同所置換術により人工血管を移植し、移植 1, 3, 12ヶ月後に組織を摘出した。摘出後、CD31, CD105, CD34, Flk-1 の免疫染色から内皮化の評価、 $\alpha$  SMA 染色から中膜における平滑筋細胞の再細胞化・リモデリングを評価した。

**【結果と考察】** ヤギに対する同所置換により人工血管を移植し、1年後血管開存を超音波エコーにより認めた。移植部位の血管を摘出して免疫染色により観察した結果、血管内腔には内皮細胞層が形成され、中膜領域には  $\alpha$  SMA で染色される平滑筋が観察された (Figure 2)。Native 血管と比較して平滑筋細胞の密度は低かった。同様に、ミニブタへの移植により内膜や中膜における細胞の再生プロセスを評価した結果、早期に補足された血管内皮系前駆細胞は、移植後 3ヶ月で前駆系マーカーの発現が消失して成熟化した。さらに、中膜には  $\alpha$  SMA 陽性細胞を認めたことから、移植 3ヶ月で血管組織様の構造が再生することが明らかとなった。さらに、異所置換の移植結果より、吻合部近傍では Native 血管側から増殖する内皮細胞が内皮化に寄与している事も明らかとなった。

以上のことから、ペプチド修飾脱細胞血管の移植は、3ヶ月で内膜層の成熟化と中膜構造の誘導を達成することで血管様構造の組織再生を実現化できる事が示された。

1. Mahara A. et al. *Biomaterials*, **58**, 54-62 (2015)

### Mid and long-term process for tissue regeneration of peptide-modified acellular graft

Atsushi Mahara<sup>1</sup>, Kentaro Kojima<sup>1, 2</sup>, Yoshiaki Hirano<sup>2</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

Tel: +81-6-6833-5012 x2637, Fax: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

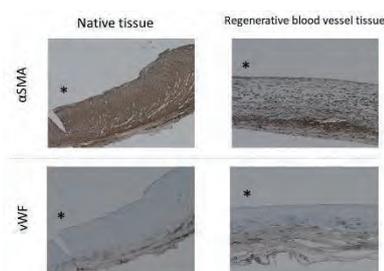


Figure 2 Maturation of regenerative blood vessel tissue after transplantation for 12 months. \*: luminal side

## 生分解性インジェクタブルポリマーを用いた脂肪由来幹細胞の局注による虚血性心疾患治療

<sup>1</sup> 関西大 ORDIST, <sup>2</sup> 関西大化学生命工, <sup>3</sup> 大阪医大, <sup>4</sup> 関西大医工薬連携研究セ

○能崎優太<sup>1</sup>, 高井宏樹<sup>2</sup>, 藤原壮一郎<sup>2</sup>, 伊井正明<sup>3</sup>, 打田裕明<sup>3</sup>, 根本慎太郎<sup>3</sup>, 葛谷明紀<sup>2,4</sup>, 大矢裕一<sup>2,4</sup>

### 【緒言】

生体内に注入すると *in situ* でヒドロゲルを形成するインジェクタブルポリマー (IP) は、細胞などを溶解・懸濁することができるため、組織再生用足場材料等への応用が期待されている。我々はこれまでに、生分解性 IP として、カプロラクトン-グリコール酸共重合体 (PCGA)

とポリエチレングリコール (PEG) から成るトリブロック共重合体 (PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA) (tri-PCG) を基盤として、その医療応用について報告してきた<sup>1)</sup>。特に近年では、体温に応答して物理架橋を形成したのちに化学架橋ゲルへと移行し、体内で長期間ゲル状態を維持できる IP システムを報告している<sup>2)</sup>。tri-PCG-Acryl 水溶液と、水に不溶な 6 官能チオールである Dipentaerythritol-hexakis(3-mercaptopropionate) (DPMP) を内包した tri-PCG ミセル水溶液を混合した IP 製剤を開発した。この製剤では、温度上昇に伴いミセルが会合して物理架橋形成によりゲル化が起こった際に、会合したミセル内部でチオール-エン反応により共有結合が進行するため (Scheme 1), 不可逆的なゲルを形成する。一方、脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: AdSC) は容易に入手可能な幹細胞ソースとして注目されており、AdSC が分泌するサイトカインが血管新生作用を示すことなどが報告されており、AdSC の体内投与は組織再生に有用であると考えられる。本研究では、不可逆的なゲル化を示す IP システムを用いて AdSC を体内投与した後に投与部位にとどめ、サイトカインの分泌などによって組織を修復・再生させることを意図して、IP 水溶液と AdSC を混合後、ゲル化させた後の細胞の生存および増殖、さらに AdSC の遺伝子発現について調査し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の分泌能力を調査した。

### 【実験】

WST-8 assay を用いて各 IP 製剤の水溶液のマウス線維芽細胞 L929 に対する細胞毒性を調査した。また Live/Dead assay により、IP ゲル中で培養したマウス由来 AdSC の生細胞数を計測した。続いて、IP ゲル中で培養した AdSC のサイトカイン分泌能を調査するために、所定時間 IP ゲル中で培養した AdSC の遺伝子発現を RT-PCR で調査した。さらに IP ゲルによってマウスの心虚血部位に投与した細胞とゲルの残存性を蛍光ラベル化 AdSC と IP を用いて調査した。

### 【結果と考察】

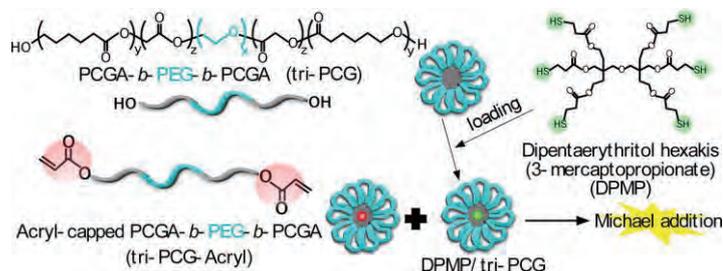
IP 製剤 [DPMP/tri-PCG+tri-PCG-Acryl] 水溶液の濃度が 1.0wt% の際の細胞生存率はおよそ 80% を維持している結果が得られたことから、その毒性は極めて低いことが分かった。物理架橋ゲルおよび化学架橋ゲルを用いて、AdSC を培養したところ所定時間後に一定数以上の生細胞をゲル中で保持できることも明らかとなった。IP ゲル中で培養した AdSC の VEGF の発現は、物理架橋ゲルよりも化学架橋ゲル中で培養した方が高いことが分かった。マウス心虚血部位へ注入後の AdSC の残存性は、化学架橋ゲルを用いた方が高いことも明らかとなった。以上より、温度応答型生分解性 IP は、AdSC を用いた虚血性心疾患の治療にとって有用であると考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Y. Ohya *et al.*, *Polym. J.*, **2014**, *46*, 632-635.
- 2) Y. Ohya *et al.*, *Biomater. Sci.*, **2017**, *5*, 1304-1314.

### Local injection of adipose-derived stem cell delivery using biodegradable injectable polymer systems for ischemic heart disease therapy

Yuta YOSHIZAKI<sup>1</sup>, Hiroki TAKAI<sup>2</sup>, Soichiro FUJIWARA<sup>2</sup>, Masaaki II<sup>3</sup>, Hiroaki UCHIDA<sup>3</sup>, Shintaro NEMOTO<sup>3</sup>, Akinori KUZUYA<sup>2,4</sup>, Yuichi OHYA<sup>2,4</sup>, (<sup>1</sup>ORDIST, Kansai University, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan, <sup>2</sup>Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, <sup>3</sup>Osaka Medical College, <sup>4</sup>CEMP, Kansai University) Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: [yohya@kansai-u.ac.jp](mailto:yohya@kansai-u.ac.jp)



Scheme 1. Preparing of [DPMP/tri-PCG + tri-PCG-Acryl] IP formulation.

## 生分解性の異なるシルクゲル注入による心筋ネガティブリモデリングの抑制

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

○神戸 裕介, 山岡 哲二

### 【緒言】

心筋梗塞 (MI) に対するゲル注入治療法による心筋線維化と心肥大の悪循環 (心筋ネガティブリモデリング) の抑制は, 注入されたゲルが左心室壁を厚くし, 心筋にかかる力学負荷を軽減することによると考えられている<sup>[1]</sup>. しかし, 非生分解性のゲルを注入した場合, 左室壁は厚くなるものの心機能が改善しないとの報告があり<sup>[2,3]</sup>, 本療法の治療メカニズムは不明なままである. 我々は, 炎症反応や再生組織による置換に関与する, ゲルの生分解性 (残存期間) に着目している.

家蚕が産生するシルクフィブロイン (SF) は, 水溶液状態を出発点として, 力学刺激などにより物理ゲルを形成する. SF ゲルは, その濃度により, 数 Pa から 6 MPa もの広範囲に渡る圧縮弾性率を示すため<sup>[4]</sup>, 左心室壁厚を維持し得る力学強度を有している. また, *in vivo* での SF ゲルの生分解は血管内皮細胞 (EC) に先導される形でゲルに浸潤するマクロファージや線維芽細胞に依ることが分かっている<sup>[5]</sup>. 本研究では, SF ゲルの生分解性を改変するため, ゲル内への EC の浸潤を促進するペプチドを作製し, これを SF ゲルを修飾した. ペプチド修飾 SF ゲル (SF+Pep ゲル) は SF ゲルに比べて短い生分解性を有していたため, 両ゲルを MI モデルラットに適用し, ゲルの生分解性が本療法の治療効果に及ぼす影響を検討した.

### 【実験】

遺伝子組換え大腸菌技術を用いて, EC 浸潤促進ペプチドを作製した. 本ペプチドは, EC 接着性 REDV ペプチドや血管内皮細胞増殖因子模倣 QK ペプチドなどから成る. SF ゲル (SF, 2%), SF+Pep ゲル (SF, 2%; ペプチド, 0.012%) を作製し, 一軸圧縮試験により弾性率を測定した. また, 両ゲルを SD ラット (7-9 週齢, ♂) の背部皮下に埋入し, 一定期間毎に取り出して組織学的評価を行うことでゲルの生分解性を算出した. SD ラット (7 週齢, ♂) の冠動脈を永久結紮することで, MI モデルを作製した. 結紮から 1 週後, 梗塞部にゲルを 100-150  $\mu$ L 注入した. その後, 12 週に渡り心エコー評価を行い, 左室拡張末期径 (LVDd), 左室収縮末期径 (LVDs) を計測した.

### 【結果と考察】

SF ゲル, SF+Pep ゲルの弾性率は, いずれも約 8 kPa であり, ペプチド修飾による弾性率の変化は認められなかった. 両ゲルをラット背部皮下に埋入した結果, ペプチドで修飾することで SF ゲルへの血管内皮細胞, マクロファージの浸潤が促進された. また, SF ゲル, SF+Pep ゲルの生分解性はそれぞれ 3.1, 1.8 weeks/mm であり, ペプチド修飾によって SF ゲルの生分解性が有意に短くなった. そこで, SF ゲル, SF+Pep ゲルをそれぞれ低・高生分解性ゲルとして MI モデルラットに適用した結果, SF 群の LVDd, LVDs は, SF+Pep 群のそれらに比べて, 有意に低い値を示した. 従って, 注入された SF ゲルの生分解性が長いと, MI 後の心肥大が抑制されることが示された. 以上, ペプチド修飾により, SF ゲルの弾性率を変化させずに生分解性を変化し得ること, 心筋梗塞に対する SF ゲル注入の治療効果にはゲルの生分解性が影響することが示された.

### 【参考文献】

[1] JACC Heart Fail 2013;1:252, [2] J Card Fail 2009;15:629, [3] PLoS One 2011;6:e21571, [4] Biomacromolecules 2004;5:786, [5] J Mater Chem B 2017;5:7557

---

### Effects of biodegradation of a silk fibroin hydrogel on the prevention of negative left ventricular remodeling after myocardial infarction

Yusuke Kambe and Tetsuji Yamaoka

Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

Tel: +81-6-6833-5012 (ext2637), Fax: +81-6-6835-5476, E-mail: [yamtet@ncvc.go.jp](mailto:yamtet@ncvc.go.jp)

## 脱細胞化小口径動脈グラフトの作製と in vivo 評価

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 物質医工学分野

<sup>2</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 脱細胞化再生医療材料学研究部門

<sup>3</sup>物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点

○橋本 良秀<sup>1,2</sup>, 山下 暁立<sup>2</sup>, 張 永巍<sup>1,2</sup>, 船本 誠一<sup>1,2,3</sup>, 岸田 晶夫<sup>1</sup>

### 【緒言】

心臓血管外科領域における置換用血管として種々の人工素材が使用されている。現在、大・中口径人工血管の開存性や耐久性に関しては概ね満足できる状況にあるが、小口径血管（内径 6mm 未満）においては未だ自己血管より優れるものは開発されていない。透析用グラフトや末梢血管領域では合成高分子製の人工血管が用いられているが、早期血栓形成や血管狭窄の問題から自己血管がグラフトとして選択されており、自己血管の採取に伴う侵襲や代替血管不足などの問題が残されている。一方、脱細胞化血管は、生体に由来する組織構造や物性が保持されており、移植後に自己細胞がグラフトに浸潤することによる自己組織化が期待できることから高機能な医療用デバイスとして欧米を中心に活発な研究が行われている。本研究では、ウシ由来の脱細胞化小口径血管を作製し、医用ミニブタを用いて小口径動脈グラフトとしての有用性について検討した。

### 【実験】

ウシ前及び後脚より血管を採取し、外膜側結合組織をトリミングした。高静水圧 (High hydrostatic pressure: HHP) 法により脱細胞化血管を作製した。脱細胞化の評価として、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行なった。クラウン系ミニブタ (n=4, 体重約 15kg) の頸動脈一側に、作製した脱細胞化血管 (内径 3~4mm, 長さ 5cm 以上) を移植した。移植前後において超音波エコーを用いて自己及び移植血管の血流を測定した。移植 1 カ月後に血管を摘出し、開存性及び細胞浸潤について組織学的に評価した。

### 【結果と考察】

脱細胞化血管を組織学的に評価した結果、細胞除去が達成され、コラーゲンやエラスチンの配向に変化は見られず、血管壁構造も良好に維持されていた。超音波エコー検査より 4 頭全例で移植した脱細胞化小口径動脈グラフトが開存していることが明らかとなった。内 1 頭では血流が減少しており、剖検時において血栓形成が確認されたが、他 3 頭においては、移植グラフトの血流は移植前と同程度であった。以上より、脱細胞化ウシ血管の小口径動脈グラフトとしての応用可能性が示唆された。

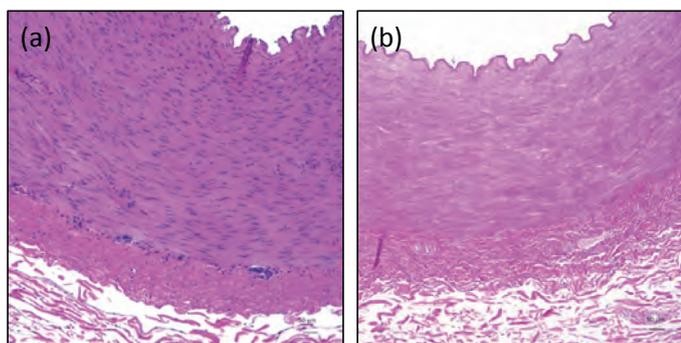


Figure 1 H-E stained images of small-diameter vascular grafts before (a) and after (b) decellularization.

### Preparation and characterization of decellularized small-diameter vascular grafts

Yoshihide HASHIMOTO<sup>1,2</sup>, Akitatsu YAMASHITA<sup>2</sup>, Yongwei ZHANG<sup>1,2</sup>, Seiichi FUNAMOTO<sup>1,2,3</sup>, Akio KISHIDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Material-Based Medical Engineering, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>Division of Acellular Tissue and Regenerative Medical Materials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3</sup>International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

Tel: +81-3-5280-8029, Fax: +81-3-5280-8005, E-mail: hashimoto.atrm@tmd.ac.jp

## 生体吸収性マグネシウム合金スキャフォールドの経皮的冠動脈インターベンションへの応用

<sup>1</sup>株式会社日本医療機器技研, <sup>2</sup>物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点, <sup>3</sup>熊本大学 大学院先端科学研究部

○佐々木 誠<sup>1</sup>, 山本 玲子<sup>2</sup>, 新留 琢郎<sup>3</sup>

【緒言】虚血性心疾患は日本人の死因第二位であり、その症状は高齢層のみならず若年層へも拡大している。既存の冠動脈ステントは半永久的に患部に残存することから、生分解性ステント（生体吸収性スキャフォールド）の臨床効果が注目されている。しかしながら、ポリ乳酸を基材とする生体吸収性スキャフォールドの臨床試験では、遅発性血栓症を惹起する所見が認められ、生体吸収性素材としての弱点を露呈する結果に終わった。一方で、膨大な臨床試験の解析は、生体吸収性スキャフォールドに要求されるスペックならびに性能を明白化した。

そこで本研究では、マグネシウム合金（Mg合金）を基材とする生体吸収性スキャフォールドの非臨床試験およびFirst-in-Man試験におけるPOC取得を最終目標に、形状最適化技術ならびに表面機能化技術を集積したMg合金スキャフォールドを作製した。

発表では、当該Mg合金スキャフォールドのスペック・特性を提示すると共に、ブタ冠動脈留置による性能（血管支持性・分解性・抗炎症性等）評価結果を報告する。

【実験】レーザー加工および電解研磨による精密制御技術を用いて、鏡面性状Mg合金スキャフォールド基材を調製した。得られた基材にフッ素処理およびカーボン処理を施すことによって防食性を付与した後、超音波スプレー法によって免疫抑制剤（シロリムス）含有生分解性ポリマーを全面に被覆した。このような手順により、Mg合金/フッ化物層/ナノカーボン層/ポリマー層から構成されるMg合金スキャフォールドを得た。作製されたサンプルをバルーンカテーテルに搭載（縮径）した後、滅菌を経てデリバリーシステム（最終形態）を完成させた（図1）。そして、血漿模擬溶液中において、任意の条件で所望サイズに拡張（拡張）した後、サンプルの経時的な分解（腐食）挙動を評価した。また、ブタ冠動脈留置試験に基づいて、サンプル性能を評価した。

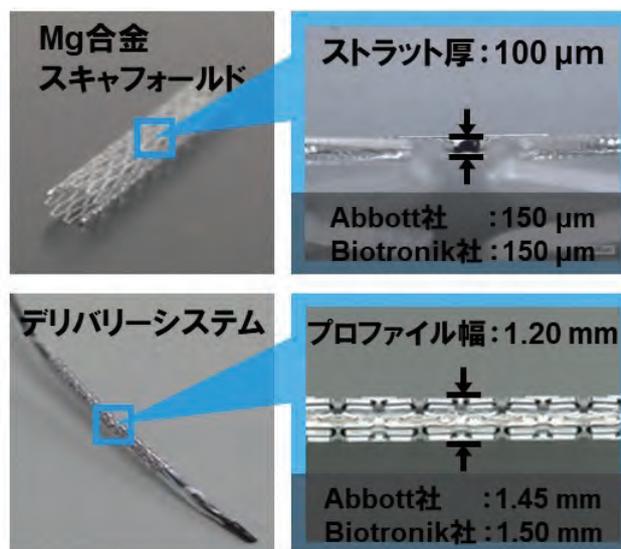


図1 Mg合金スキャフォールド

【結果と考察】フッ素処理およびカーボン処理条件は、Mg合金基材の表面性状（防食効果）に影響を及ぼす。血漿模擬溶液中における拡張・浸漬試験において、最適化されたサンプルは所望の腐食挙動を示した。このことから、基材表面に構成された各層が物理変化（縮径ならびに拡張）に対する追従性を有しており、至適な防食効果を発揮したことが示唆された。また、ブタ冠動脈留置試験では、最適化サンプルの優れた物性（血管支持性）ならびに生体適合性（抗炎症性）を示す所見が認められ、経皮的冠動脈インターベンションへの応用実現性を見出した。

### Magnesium alloy-based bioresorbable scaffold for percutaneous coronary intervention

Makoto Sasaki<sup>1</sup>, Akiko Yamamoto<sup>2</sup>, Takuro Niidome<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Japan Medical Device Technology Co., Ltd.

<sup>2</sup> Research Center for Functional Materials National Institute for Materials Science

<sup>3</sup> Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University

Tel: +81-96-285-8278, Fax: +81-96-285-8279, E-mail: m.sasaki@jmdt.co.jp

## 組織工学材料を指向したシルクフィブロイン/生分解性ポリマー混合不織布の創製

<sup>1</sup>東京農工大学 生命工学専攻、<sup>2</sup>東京農工大学 共同獣医学科、<sup>3</sup>日本医科大学 循環器内科  
○中澤 靖元<sup>1</sup>, 服部 夏衣<sup>1</sup>, 沼田 香織<sup>1</sup>, 村上 智亮<sup>2</sup>, 太良 修平<sup>3</sup>

【緒言】これまで本研究グループでは、優れた機械的強度や細胞応答性を有するシルクフィブロイン(Silk Fibroin: SF)に対し、種々の高分子化合物をブレンドさせたナノファイバーシートを作製し、心血管系材料を指向した材料開発を実施してきた。特に SF とウレタン系高分子化合物(Pellethane®)をブレンドしたナノファイバーシートについては、動物埋植試験の結果、炎症性が低く、組織再生能、抗石灰化に優れることが明らかとなり、SF 基盤材料の有用性を示すことができた。そこで本研究では、生分解性ポリマーである、ポリトリメチレンカーボネート(PTMC)と SF を混合したナノファイバーを作製し、各種物性試験、構造解析および、酵素による分解性実験により、微細構造とダイナミクスの経時的変化を追跡した。

【実験】重量比 SF/PTMC=100/0、70/30、50/50、30/70 の混合試料を調製しエレクトロスピニング法により不織布を作製した。得られた不織布に対し、走査型電子顕微鏡観察、水中下における引張試験、マウス皮下及びヒツジ肺動脈壁への埋植試験を行った。さらに、リパーゼ(*Thermomyces lanuginosus* 由来)およびエラスターゼ(*Porcine pancreas* 由来)による 37℃での分解試験を実施した。分解試験後の不織布は、水中動的粘弾性測定及び、パルス NMR 法による  $T_2$ 緩和時間測定から混合比に伴う分子運動性の変化を考察した。

【結果と考察】4種類の不織布のうち、PTMCの含有量が0~50%ではナノオーダーの繊維径を持つ均一な繊維を形成したが、30/70では不溶化時のPTMCの溶解により一部フィルム化が生じた。水中引張試験より得たヤング率と破断伸度は、SF単体不織布が最も高く、PTMCの濃度依存的に有意に低下したことから、SFにPTMCを混合することでSFの脆性改善が確認された(Table 1)。さらに、マウス皮下への埋植試験ではSF/PTMC=50/50の不織布において埋植期間経過に伴い線維化厚の低下が生じ、炎症反応の抑制が示唆された。また、ヒツジ肺動脈壁への埋植試験(3ヶ月)の結果、不織布表面にコラーゲンやエラスチン等が層状に生成しており、自己組織の再生が期待される一方、細胞の浸潤は認められず、足場の分解と組織置換は予想よりも軽度であった。そこで、リパーゼを用いた加速分解試験を実施した。その結果、SF/PTMC=50/50では分解日数に応じて重量損失が見られ(Fig. 2)、また貯蔵弾性率、損失弾性率共に減少傾向であった。パルス NMR による  $T_2$ 緩和時間測定の結果では、SF/PTMC=50/50のみ分解開始1日後から緩和時間の長い成分が出現し、7日後まで成分割合が増加した。 $T_2$ 緩和時間は分子運動性と正の相関を示すことから、分解に伴う局所ドメインの運動性の変動が示唆される。発表では、SF/吸収性ポリウレタンによるナノファイバーシートの各種解析結果についても報告する。

Table 1. Young's Modulus and Strain at Breaking of SF/PTMC composite sheets.

SF/PTMC	Young's Modulus(MPa)	Strain at Breaking(%)
100/0	14.13	69.9
70/30	9.26	70
50/50	6.38	139.6

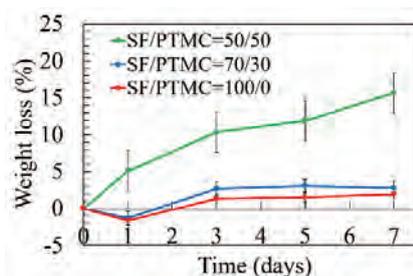


Fig. 1. Weight loss ratio of enzymatic degradation of SF/PTMC composite sheets.

### Fabrication and *in vitro* Degradation of Silk Fibroin Based Biomaterial Scaffolds for Tissue Engineering Material

Natsui Hattori<sup>1</sup>, Kaori Numata<sup>1</sup>, Toshiharu Murakami<sup>2</sup>, Shuhei Tara<sup>3</sup>, Yasumoto Nakazawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan, Tel & Fax: +81-42-388-7612, E-mail: [yasumoto@cc.tuat.ac.jp](mailto:yasumoto@cc.tuat.ac.jp)

<sup>2</sup>Graduate School of Agrivulture, Tokyo University of Agriculture and Technology

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Nippon Medical School

## 「文部科学省における医療技術開発の支援及びナノテクノロジー・

### 材料科学技術の推進」

文部科学省研究振興局ライフサイエンス課

砂 真一郎

文部科学省研究振興局参事官（ナノテクノロジー・物質・材料担当）付

村上 望

文部科学省では医薬品、医療機器など医療技術に関する支援をおこなっており、文部科学省ライフサイエンス課では重点分野の一つ「オールジャパンでの医療機器開発」について、基礎研究から実用化をめざす医療技術の体系的支援を行っている。新規医療機器を開発するための基礎的なフェーズの研究への支援を行い、他省庁事業との連携を行うことにより、新しい医療機器の薬事申請を目的とした臨床研究・医師主導治験を行う臨床フェーズの研究まで、実用化を目指して幅広い研究ステージの支援に繋げている。

医療機器の開発においては、医療に関する知識や経験、さらに医療現場におけるニーズの把握を必要とし、また薬事承認制度や保険制度などの規制の下で開発を行う必要がある点で産業用機械の開発とは大きく異なっている。このような異業種連携が必須となる医療機器開発の場を整備するために、文部科学省は「ネットワーク構築事業」において人材育成を推進している。本事業においては、高度な医療ニーズを見出し、的確に対応した医療機器の開発を推進することを通じて、医療機器開発に関わる人材を医療現場で育成することを目指している。

ナノテクノロジー・材料科学技術は、ライフサイエンスやエレクトロニクス、環境・エネルギーなど幅広い産業課題・社会課題を解決に導く分野横断的な基盤技術である。また、我が国の産業基盤を支え、高い国際競争力を有する技術でもある。文部科学省では、ナノテクノロジー・材料科学技術を今後も我が国の“強み”としていくとともに、Society 5.0や国連サミットにおいて採択された「持続可能な開発目標（SDGs）」等の実現に貢献するべく、本分野において今後重点的に取り組むべき課題等を中心に「ナノテクノロジー・材料科学技術 研究開発戦略（平成30年8月）」をとりまとめた。

シンポジウムの中では、文部科学省の支援事業や戦略の概要を御紹介するとともに、ナノテクノロジー・材料科学技術の推進に係る関係施策の内容についても併せて御説明する。

### 医療機器研究開発とバイオマテリアル

国立研究開発法人日本医療研究開発機構産学連携部

仲山賢一

日本医療研究開発機構の産学連携部の医療機器研究開発支援は、「オールジャパンでの医療機器開発」として、基礎研究・応用研究・非臨床研究・臨床研究および治験を一貫して支援することを特徴としている。

その内容は、新規医療機器を開発するための新しい原理の証明やプロトタイプ製作のような基礎的なフェーズの研究（文部科学省医療分野研究成果展開事業・先端計測分析技術・機器開発プログラム）から、新しい医療機器の薬事申請を目的とした臨床研究・医師主導治験を行う臨床フェーズの研究（厚生労働省：医療機器開発推進研究事業、経済産業省：医工連携事業化推進事業）まで、幅広い研究ステージを支援している。

さらに医療機器の研究開発は、医療に関する知識や経験、ニーズを必要とし、また薬事承認制度や保険制度などの独特の規制の下で開発を行う必要があるという点で産業用機械の開発とは大きく異なっている。このような異業種連携が必須となる医療機器開発の場を整備するために、日本医療研究開発機構は厚生労働省事業「国産医療機器創出促進基盤整備等事業」を推進している。この事業においては、医療機器開発に携わる人材を医療現場で育成することを通じて、医師等との交流の場を確保して高度な医療ニーズを見出し、その医療ニーズに的確に対応した医療機器の開発を推進することを目指している。また、薬事申請・事業化・知財化戦略について専門家からの助言を受けたいという企業には、医療機器開発支援ネットワークを通じた「伴走コンサルティング」も実施している。

本講演では、これらの支援事業について紹介するとともに、医療機器の研究開発において重要な役割を持つバイオマテリアルに関するいくつかの研究を紹介する。

### 医療技術の高度化に向けたバイオマテリアルデザインとその製品化

連携会員：名古屋工業大学 大学院工学研究科 生命・応用化学専攻 環境セラミックス分野  
春日 敏宏

超高齢社会にある我が国では、医療技術の高度化が最重要課題となっている。また生活習慣の変化から生じる若年層の骨や筋肉の衰えも多く生じている。これらに対する効果的な予防と治療が望まれるところである。そのためには、一層の材料機能の向上や革新的医療技術の提案、つまり新たなバイオマテリアルデザインの提示を続ける必要がある。また、我が国のバイオマテリアル研究は世界トップレベルにあると信じるが、これを強くアピールして世界戦略へつなぐことも重要な視点と考える。

たとえばセラミックス人工骨（骨補填剤）は、メーカーの大きな努力もあって国産品が広く使用されているもののひとつである。人工骨材料の形状は、連通孔・多孔質ブロック形状、顆粒状、シート状、ソフトパテ状へと進歩し、骨形成に有効で手術室でのハンドリング性（形状加工性、加工性、保水性等）に優れた扱いやすい形態となってきている。ただ、骨欠損部の形状は様々であることから、任意形状に収まるよう高い柔軟性を有していることや脱落しにくいこと等が、まだまだ望まれているところである。

筆者らは、機能を拡張する試みのひとつとして、材料をファイバー化して全体を綿形状とすることを考えてみた。手術室で任意の形状への成形ができ、生体内に埋入した際に自然に高气孔率が確保される。吸水・保水性に優れるので、自己血や骨髄穿刺、また自家骨と混合して使用することもできる。この材料は米国でようやく実用化したところであるが、筆者らの開発例を紹介し、バイオマテリアルの基礎研究とその製品化研究について考える機会となればと思っている。

---

#### **Biomaterials Design for Creating Innovative Medical Technologies**

Toshihiro Kasuga

Division of Advanced Ceramics, Department of Life Science and Applied Chemistry,

Nagoya Institute of Technology

Tel&Fax: +81-52-735-5288, E-mail: kasuga.toshihiro@nitech.ac.jp

### 医歯薬工連携研究に於けるハードルと夢～生体材料工学研究者の立場から

日本学術会議連携会員

バイオマテリアル学会常任理事

大阪大学大学院工学研究科・生体材料学領域

中野貴由

バイオマテリアル・再生医工学研究を希望する学生数は年々増加傾向であるが、工学系生体材料研究者への企業求人数は必ずしも多くなく、とりわけ国内資本企業の求人は伸び悩んでいる。この原因の一つは一部の医療機器デバイス領域を除いて国内資本企業の市場占有率が極めて低く、例えば人工関節市場では20%にも満たない。こうした状況を打破するには国産医療デバイス製品の基礎研究から臨床応用まで一気に通貫する必要がある、開発スタートから臨床応用に至るまでのリードタイムを短縮するとともに、オリジナリティーの高い製品を日本発で創製するための効果的な医歯薬工連携が不可欠である。

ただし、医歯薬工連携と一言でいってもその遂行は必ずしも容易ではない。その理由として、(1) 基礎研究段階からの医歯薬工連携体制の構築、(2) 長期にわたる研究費の獲得と研究ステージごとの研究費の連続性の担保、(3) 境界研究であるがゆえの広範囲な設備の保有と維持、(4) 共通の知的的好奇心と臨床応用に向かうまでの長期間にわたるモチベーション共有、など多数の解決すべきハードルの高い課題が待ち構えているためである。当研究室でも、過去には航空宇宙材料の基礎研究をベースとした研究テーマから、20年近く前に生体組織構造の解明に基づく生体材料の基礎研究と臨床研究へと舵を切った。共通するキーワードは、極限状態における「異方性の材料科学の構築」であり、研究テーマとしては自身に全く違和感はなかった。しかし現実に研究をスタートすると、本来共通で持つことも可能な大型設備（例えば、複数の異なるCT装置や仕様の異なる $\mu$ XRD装置、金属3Dプリンタなど）や動物使用施設の設置（P2A）、細胞実験室の設置など恒常的な経費の獲得の必要性に加え、息の合う柔軟な発想の他分野研究者との出会いと継続的な連携が成否を決めることになる。こうした連携環境・連携投資についての理想的な在り方について、バイオマテリアル研究を志す若手研究者に夢を与えるような議論のきっかけとしたい。

## PMEA/水界面の微細構造形成における分子量効果と生体親和性との相関

<sup>1</sup>九州大学大学院工学府, <sup>2</sup>九州大学先端物質化学研究所, <sup>3</sup>山形大学有機材料システム研究推進本部

○馬渡 なみ<sup>1</sup>, 園田 敏貴<sup>1</sup>, 村上 大樹<sup>1, 2</sup>, 田中 賢<sup>1, 2, 3</sup>

【緒言】生体組織・成分と接触する材料には、生体に悪影響を及ぼさない「生体親和性」が必須であり、用途に応じて、「抗血栓性」または「細胞接着性」が求められる。ポリ(2-メトキシエチル アクリレート) (PMEA)は、血球細胞は接着しない一方で、正常細胞やがん細胞は接着する「細胞接着選択性」を有している。これまで当研究室では、PMEA が細胞接着選択性を発現する要因として、高分子鎖と中程度に相互作用する「中間水」の存在が重要であることを報告してきた<sup>1)</sup>が、その詳細なメカニズムはこれまでのところ明らかにされていない。最近では新たに、中間水を有するPMEA や PMEA 類似体の水界面において、高分子と水の相分離により形成されるナノメートルスケールの微細構造の存在、さらに血栓形成に関与するフィブリノーゲンが微細構造の高分子密部(凸部)に選択的に吸着している様子が観察されている<sup>2)</sup>。本研究ではこの微細構造が PMEA の細胞接着選択性に関係する重要な要因であると考え、PMEA の分子量を変化させることにより微細構造を制御し、細胞接着選択性との相関を解明することを目的とした。

【実験】サンプルとして、フリーラジカル重合法で合成した分子量の異なる PMEA ( $M_n$ : 19, 30, 44, 183 kg/mol)を用いた。PET 基板上に作製したスピコート膜の PBS 中における界面形態観察を、原子間力顕微鏡を用いて行った。また、抗血栓性および細胞接着性評価として、それぞれに関与するタンパク質(フィブリノーゲンおよびフィブロネクチン)の吸着量および細胞接着部位の露出度、さらに血小板粘着数と細胞接着数の評価を行った。なお、タンパク質の吸着量および細胞接着部位の露出度はそれぞれキャスト膜上での MicroBCA 法および ELISA 法により評価した。血小板粘着および細胞(NIH3T3)接着評価では、それぞれスピコート膜上において1時間 37°Cでインキュベート後の接着数を定量した。

【結果と考察】PBS 中における各分子量の PMEA の界面形態観察を行った結果、PMEA19k, 30k, 44k ではおよそ同程度のサイズの界面構造が観測されたのに対し、183k では凸部のサイズが明らかに大きい様子が観察された(Fig. 1)。また、フィブリノーゲンの吸着量は異なる

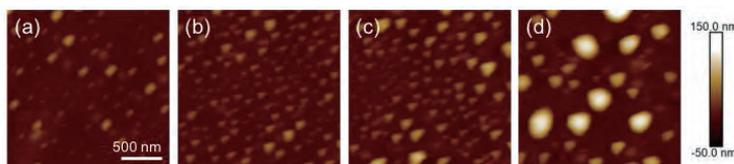


Fig. 1 Topography of PMEA/PBS interface. (a)PMEA19k, (b)PMEA30k, (c) PMEA44k, and (d)PMEA183k

分子量間で大きな差は見られなかったが、 $\gamma$ 鎖の露出度および血小板粘着数では PMEA183 のみ有意に高い結果が得られた。一方、フィブロネクチンの吸着量・細胞接着部位露出度および細胞初期接着数は、PMEA183 のみ有意に低く、前述の抗血栓性評価とは対照的な結果を示した。これらの結果は、微細構造の凹凸サイズの違いと、微細構造上でのタンパク質の特異的吸着挙動が大きく影響していることが考えられる。発表では、微細構造上でのタンパク質の特異的吸着および変性挙動の詳細と合わせて、微細構造と細胞接着選択性との関係の定量的な考察について報告する。

## 【参考文献】

- 1) M. Tanaka, *et al.*, *Polymer J.*, **2013**, 45, 701-710.
- 2) D. Murakami, *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2016**, 2, 2122-2126.

**Molecular weight effect on nanostructure formation at PMEA/water interface and biocompatibility.**

Nami Mawatari<sup>1</sup>, Toshiki Sonoda<sup>1</sup>, Daiki Murakami<sup>2</sup>, Masaru Tanaka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Kyushu University, <sup>2</sup>Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, <sup>3</sup>Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University

<sup>1</sup>Tel/Fax: +81-92-802-6238, E-mail: masaru\_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

## Proliferation and Organization of Encapsulated Cells in Phospholipid Polymer Hydrogel Networks

<sup>1</sup>Department of Bioengineering, <sup>2</sup>Department of Materials Engineering, School of Engineering, the University of Tokyo

○Ren ZHANG<sup>1</sup>, Tomohiro KONNO<sup>1</sup>, Yuuki INOUE<sup>2</sup>, Kazuhiko ISHIIHARA<sup>1,2</sup>

### 【Introduction】

The salient properties both physically and chemically make hydrogel the first candidate of the scaffold material in the field of tissue engineering. For the tissue engineering and tissue regeneration, the scaffold materials provide sufficient spaces with network structures for cells to invaded in and regenerate a new tissue with the base of the scaffold. The researches to date mainly focused on the influence of scaffold material properties on laden cells. But the bioactivities of the laden cells inside of the hydrogel will also change the properties of the hydrogel, which is rarely concerned. In this research, we focused on the laden cellular activities influences on hydrogel. The poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co-n*-butyl methacrylate-*co-p*-vinylphenylboronic acid-*co-n*-hydroxysuccinimide) (PMBV-NHS) and poly(vinyl alcohol) (PVA) were selected as the platform material due to the high cytocompatibility of MPC that suppresses the adverse influence to the laden cells. From this research, the property change of the implantable material *in vivo* can be better investigated.

### 【Experimental】

The PMBV-NHS was synthesized by a conventional radical polymerization process and  $\alpha, \alpha'$ -azoisobutyronitrile (AIBN) was used as the initiator. The chemical structure of PMBV-NHS was verified by <sup>1</sup>H-NMR. 5 wt% of the PMBV-NHS and 2.5 wt% of the PVA medium solution were used to gelation. L929 cells were laden in the hydrogel with desired cell density. The medium change of the hydrogels was performed twice per day. And the weight of the hydrogels was kept constant. The storage modulus of the hydrogel was performed with a creep meter. And cells in the hydrogel were released by dissolved the hydrogel with sorbitol/PBS solution, recollected the cells and counted by using a hemocytometer with trypan blue staining.

### 【Results and discussions】

The PMBV-NHS was synthesized successfully by conventional polymerization. After L929 cell encapsulation, the relationship of storage modulus variation with laden cell proliferation was investigated. From the results, it is obvious that the storage modulus of the hydrogel kept constant without laden cells. On the other hand, with laden cells, the storage modulus decreased (Fig. 1). After that, the cell density in the hydrogel was investigated and accompanied with an obvious increase in the laden cells, the storage modulus decreased (Fig. 2). These were due to expanded network structure by the cells during *in situ* proliferation of cells, and the storage modulus gets close to tissue (S. Lin, et al. *Pharm. Res.* **2011** 28 1422.).

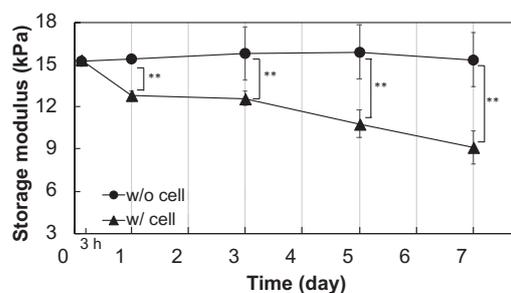


Fig. 1 The storage modulus variation with laden cells. \*\*:  $p < 0.01$ . (The initial cell density is  $10^6$  cells/mL.)

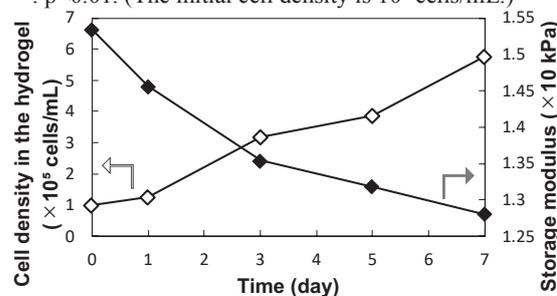


Fig. 2 The variation of storage modulus of the hydrogel with cell density of laden cells. (The initial cell density is  $5 \times 10^5$  cells/mL.)

## Proliferation and Organization of Encapsulated Cells in Phospholipid Polymer Hydrogel Networks

Ren ZHANG<sup>1</sup>, Tomohiro KONNO<sup>1</sup>, Yuuki INOUE<sup>2</sup>, Kazuhiko ISHIIHARA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioengineering, <sup>2</sup>Department of Materials Engineering, School of Engineering, the University of Tokyo

Tel: +81-3-5841-7128, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: [jun@mpc.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:jun@mpc.t.u-tokyo.ac.jp)

## 金属製培養器を用いた熱刺激による MCF-7 とヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の殺細胞効果の検討

<sup>1</sup>慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻, <sup>2</sup>東京工業大学物質理工学院材料系, <sup>3</sup>慶應義塾大学理工学部機械工学科

○井田 雄太<sup>1</sup>, 倉科 佑太<sup>2</sup>, 宮田 昌悟<sup>3</sup>, 竹村 研治郎<sup>3</sup>, 小茂鳥 潤<sup>3</sup>

【緒言】細胞内温度計や磁性ナノ粒子による細胞の加熱方法の開発、温度受容体の研究など近年、温度を基軸として生命現象を解明する試みが注目されている。その中で温度と細胞死の関係が注目されており、がん細胞の死滅温度は 43°C 程度であり、正常細胞と比較した際に死滅温度が低いことが知られている。これは、がん細胞の場合 HSP70 の核移行が生じないことに起因している。

これらの報告で用いられる熱刺激は、雰囲気温度を変化させることにより付与している。このような場合、実際に細胞に付与される熱刺激は不明瞭であり、また付与可能な熱刺激は単調なパターンになる。そこで本研究では、培養面温度制御が可能な金属製細胞培養デバイスを用いて、細胞に直接、熱刺激を付与することで殺細胞効果を検討することとした。具体的には、多様なパターンの熱刺激を付与した際の生細胞数を測定し、その際の HSP70 の挙動について免疫蛍光染色による観察により評価する。その第一段階として、本デバイスで与えた熱刺激での細胞死滅温度と加熱・冷却を繰り返し付与する熱刺激の場合の殺細胞効果について検討した結果を報告する。

【実験】まず、細胞の死滅温度を検討する実験を行った。培養面温度制御が可能な金属製細胞培養デバイス (Figure 1) に細胞を播種し、37°C で 1 日通常培養した後、2 時間の熱刺激を付与した。熱刺激付与後、培地交換を行いさらに 37°C で 1 日通常培養した。生存細胞数の測定は MTT assay により行った。次に、熱刺激時間と生存細胞数の関係を検討するため、熱刺激時間を 30 分、1 時間、2 時間として同様の実験を行った。最後に、加熱・冷却を繰り返し付与した場合の熱刺激パターンが殺細胞効果に及ぼす影響を検討するため、43°C, 12 分と 37°C・32°C, 12 分の熱刺激を 10 回連続で付与した場合の生存細胞数を評価した。

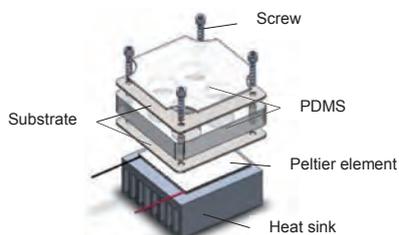


Figure 1 Metallic cell culture device controlling temperature of culture surface

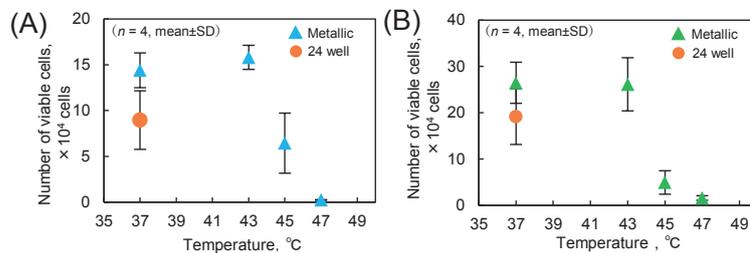


Figure 2 Relationship between number of viable cells and temperature of thermal stimulation 1 day after heating for 2 h. (A) normal cells (NHDF), (B) cancer cells (MCF-7)

【結果と考察】MTT assay により生細胞数を測定した結果、正常細胞 (NHDF) は 47°C, 2h の熱刺激でほぼ全ての細胞が死滅し、45°C, 2h で約半数の細胞が死滅した。一方、がん細胞 (MCF-7) は 47°C, 2h の熱刺激でほぼ全ての細胞が死滅したのに対し、45°C でも約 8 割程度の細胞が死滅した (Figure 2)。このことから、がん細胞が正常細胞に対し熱耐性が低いことが示された。また、熱刺激時間と生存細胞数の関係においては、1 時間で 2 時間の熱刺激とほぼ同等の殺細胞効果が示された。さらに加熱・冷却を繰り返したパターンの熱刺激において、通常培養と比較した場合に有意な差は見られなかった。このことは、12 分の熱刺激では細胞の生死に与える影響は小さいことを示唆している。

### The effect of thermal stimulation with metallic cell culture device on cell-killing of normal human dermal fibroblasts and MCF-7.

Yuta IDA<sup>1</sup>, Yuta KURASHINA<sup>2</sup>, Shogo MIYATA<sup>3</sup>, Kenjiro TAKEMURA<sup>3</sup>, Jun KOMOTORI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Integrated Design Engineering, Graduate School of Science and Technology, Keio University, <sup>2</sup> Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, <sup>3</sup> Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University

Tel: +81-45-563-1151, Fax: +81-45-563-1151, E-mail: yuta.ida29@keio.jp

## 肝臓細胞機能を向上させるための硫酸化ポリロタキサン表面の設計

<sup>1</sup>東京医科歯科大学学生体材料工学研究所有機生体材料学分野

○有坂 慶紀<sup>1</sup>, 由井 伸彦<sup>1</sup>

【緒言】 ポリロタキサン(PRX)は、環状分子(e.g.  $\alpha$ -シクロデキストリン( $\alpha$ -CD))の空洞部を貫通した線状高分子(e.g. ポリエチレングリコール(PEG))鎖の両末端に嵩高い置換基を有した超分子構造体である。この PRX の特徴は環状分子と線状高分子の機械的な連結にあり、環状分子は線状高分子鎖に沿って自由自在に摺動運動する分子可動性が期待される。これまでに  $\alpha$ -CD と PEG からなる PRX を一成分とするブロック共重合体を被膜した表面を作製し、細胞接着形態[1]や分化系統[2]をその分子可動性によって調節できることを報告している。さらに近年、骨分化を促進する成長因子(骨形成因子: BMP-2)を表面導入した分子可動性 PRX 表面を構築し、成長因子導入と分子可動性調節の相乗的な効果によって骨芽前駆細胞の石灰化を短期間で促すことに成功した[3]。

本研究では、成長因子導入と分子可動性調節の双方による細胞機能操作を肝臓細胞の機能維持に拡張するために新たな成長因子導入 PRX 表面を設計した。今回、アニオン性の硫酸化 PRX を被膜した細胞培養基材に、肝臓細胞の機能維持を促すカチオン性のヘパリン結合性上皮細胞成長因子様成長因子(HB-EGF)を表面導入した。この表面を用いて分子可動性の調節と成長因子の導入が、ヒト肝癌(HepG2)細胞における転写共役因子 Yes-associated protein (YAP)の細胞内局在およびアルブミン産生に与える影響を蛍光免疫染色および ELISA 法によって解析した。

【実験】 PEG と  $\alpha$ -CD からなる擬 PRX の両末端に 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate を修飾した PRX マクロ連鎖移動剤を用いて benzyl methacrylate (PBzMA) を可逆的付加開裂連鎖移動重合し、PBzMA-*b*-PRX-*b*-PBzMA (PRX トリブロック共重合体)を得た。続いて、 $\alpha$ -CD 部位の水酸基に 1,3-propane sultone を反応させ、硫酸化 PRX トリブロック共重合体を合成した。分子可動性の異なる PRX 表面を作製するために、 $\alpha$ -CD 貫通数の異なる PRX も同様な方法で合成した。24 ウェルプレートに硫酸化 PRX トリブロック共重合体を被膜した後、HB-EGF 溶液を加えて HB-EGF 導入硫酸化 PRX 表面を作製した。非硫酸化 PRX 表面として、PRX トリブロック共重合体を被膜した表面を用いた。これらの表面上でヒト由来肝癌由来細胞(HepG2 細胞)を培養した後、YAP の蛍光免疫染色およびアルブミン産生量の定量を行った。

【結果と考察】 作製した表面を用いて細胞内の YAP 局在について解析したところ、高い分子可動性 PRX 表面において YAP が細胞質に局在し、低い分子可動性 PRX 表面において YAP が核内に移行する傾向が認められた(Figure 1)。また、表面導入した HB-EGF は、遊離の HB-EGF と比較して YAP の核内移行を促進する傾向があったが、高い分子可動性 PRX 表面上での核内 YAP 局在の割合は低かった。YAP の核局在は肝臓細胞の脱分化およびアポトーシスを誘導するが、高い分子可動性 PRX 表面は YAP の核内移行を抑制することが示唆された。肝臓細胞機能評価としてアルブミン産生量を評価した結果、HB-EGF を表面導入した高分子可動性 PRX 表面が顕著に HepG2 のアルブミン産生を促した。これらの結果は、PRX の分子可動性と HB-EGF の表面導入による相乗的な効果によって HepG2 細胞の肝臓細胞機能が亢進されたことを示唆する。[1] *Soft Matter* **2012**, 8 (20), 5477-5485. [2] *Adv Healthcare Mater* **2015**, 4 (2), 215-222. [3] *J Biomater Sci, Polym Ed* **2017**, 28 (10-12), 974-985.

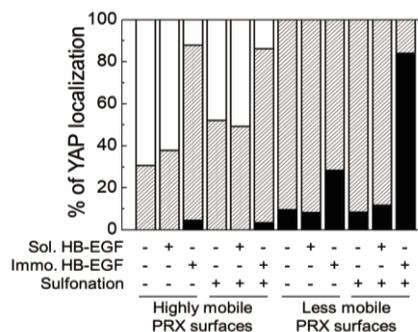


Figure 1. Proportion of nuclear YAP localization (filled bars), both nuclear and cytoplasmic YAP localization (hatched bars) or cytoplasmic YAP localization (opened bars) in HepG2 cells on each surface.

### Design of sulfonated polyrotaxane surfaces to improve hepatocyte-functions

Yoshinori Arisaka<sup>1</sup>, Nobuhiko Yui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Organic biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-3-5280-8022, Fax: +81-3-5280-8027, E-mail: arisaka.org@tmd.ac.jp

## 傾斜ジブロックポリマーブラシ構造が細胞接着と移動に与える影響

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科○松下 大志<sup>1</sup>・東 倫之<sup>1</sup>・久代 京一郎<sup>1</sup>・高井 まどか<sup>1</sup>

## 【緒言】

血管新生モデル構築や再生医療において、足場への細胞接着挙動を制御することは重要である。特に、足場材料の機械的特性と表面物性は細胞接着挙動に大きな影響を与えている。そこで本研究では、異なる物性を有するポリマーの二層薄膜傾斜構造に着目した。二層膜構造を用いることで、機械的特性・表面物性の個別制御が期待でき、傾斜構造を用いることで膜厚の細胞接着に与える影響を網羅的に調べることができ、傾斜に沿った細胞の方向性移動が期待できる。本研究では、代表的な生体不活性材料 poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (poly(MPC))を下層、細胞が良く接着するカチオン性材料である poly(2-aminoethyl methacrylate) (poly(AEMA))を表層とするジブロックポリマーブラシ(pMbA)を用いた。これは、表層の Poly(AEMA)の構造を変えることで表面の粘弾性が変化し、細胞接着に影響を与えることを報告しているためである[1]。ここでは、機械的特性を連続的に変化した傾斜ポリマーブラシの作製を行い、その上での細胞の接着形態と移動に関する挙動観察を行った。

## 【実験】

poly(AEMA)の膜厚が連続的に変化するような足場を作製するために、surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP)を用いた。重合中に反応溶液を一定速度で吸引することで、反応溶液の吸引速度に応じた傾斜ジブロックポリマーブラシを作製した。シリコンウェハ上に poly(MPC)50 量体を 20°C、24 h で作製し、その上に poly(AEMA)が 0-50 量体に連続的に変化する傾斜ポリマーブラシを 20°C、4 h、吸引速度 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  で作製した。作製した grad-pMbA の poly(MPC)層の膜厚及び poly(AEMA)層の膜厚分布を分光エリプソメトリーにより評価した。上記方法で grad-pMbA 作製したガラス基板の上にヒト正常乳腺上皮細胞(MCF-10A)およびヒト腫瘍形成性乳腺上皮細胞(MCF-7)を  $1.0 \times 10^4$  cells/mL の濃度で播種した。播種後 72 h における、傾斜表面上での細胞を位相差顕微鏡で観察した。また、タイムラプス顕微鏡により、播種後 24-48 h の細胞移動を観察した。

## 【結果と考察】

作製したポリマーブラシの膜厚は poly(MPC)層は  $6.9 \pm 0.6$  nm、poly(AEMA)層は基板 1 cm に対して膜厚が 0 nm から 4 nm に変化する表面が作製できた。播種後 72 h の細胞接着は MCF-10A では上層の poly(AEMA)の膜厚に依らず細胞の接着形態は等しかった(Fig.1 a, b)。一方で MCF-7 では poly(AEMA)層の膜厚が長い領域では凝集して接着していた(Fig.1 d)のに対して、短い領域では凝集せず接着していた(Fig.1 c)。また、細胞の移動性に関しては、MCF-10A では傾斜に沿って上層の膜厚が短い方から長い方への方向性移動が見られたのに対して、MCF-7 では細胞の移動が見られなかった。この結果は、正常細胞とがん細胞で二層膜材料、主に下層材料の機械的特性から受ける影響が異なることを示唆する結果である。

## 【参考文献】

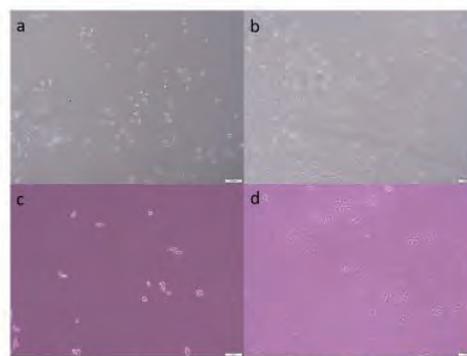
[1] T. Azuma, *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8, 10710-10716

Fig.1 (a) MCF-10A at short poly(AEMA) (b) MCF-10A at long poly(AEMA) (c) MCF-7 at short poly(AEMA) (d) MCF-7 at long poly(AEMA) (scale bar 100  $\mu\text{m}$ )

## Effects of gradient di-block polymer brush structures on cell adhesion and migration

Taishi MATSUSHITA<sup>1</sup>, Tomoyuki AZUMA<sup>1</sup>, Keiichiro KUSHIRO<sup>1</sup>, Madoka TAKAI<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku Tokyo 113-8656, Japan<sup>1</sup>Tel: +81-3-5841-7125, Fax: +81-3-5841-0621, E-mail: [matsushita@bis.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:matsushita@bis.t.u-tokyo.ac.jp)

## 可視光照射で単一細胞剥離を制御する高分子ナノ薄膜修飾基材の開発

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
○山本 光哉, 今任 景一, 武田 直也

## 【緒言】

細胞・組織工学の分野において、外部刺激により細胞接脱着が制御可能な培養基材の開発が精力的に取り組まれている。特に光刺激は、非接触のかつマイクロスケールの微小領域に局限して刺激を与え得る点で、pH や温度など他の刺激よりも優れた特長を持つ。当研究室では、光応答性スピロピラン (SP) 分子のメタクリル酸誘導体—SPMA—を導入した疎水性ブロックとポリエチレングリコール (PEG) の親水性ブロックからなるジブロック共重合体を合成し、スピノコート法でナノ薄膜とした培養基材を開発した。このジブロック共重合体の薄膜表面は、紫外 (UV) 光と可視光により表面親疎水性が可逆的に変化し、その変化の方向は SP の光異性化による極性変化と相反する新奇な現象を示す。また、UV 照射した基材表面に細胞を接着させ、細胞毒性が低い長波長の可視光照射で、細胞の剥離・回収が可能である。本研究では、これまでに疎水ブロックの主要構成要素としたメタクリル酸メチル (MMA) に代わりメタクリル酸エチル (EMA) を用い、この構造変化が光応答性表面の機能に与える影響を評価した。また、この光応答性基材上で、可視光のピンポイント照射による単一細胞レベルでの脱着制御を実現したので報告する。

## 【実験】

PEG 鎖をもつ連鎖移動 RAFT 剤を用いて EMA と SPMA を共重合し、ジブロック共重合体 P(SPMA-*r*-EMA)-*b*-PEG を合成した。共重合体の組成は NMR および GPC で解析した。この高分子をガラス基板にスピノコート法でナノ薄膜状に修飾し、 $T_g$  以上の温度でアニール処理をして光応答性細胞培養基材を作製した。この基材に PBS 中で UV 光を 20 min 照射後、マウス筋芽細胞 (C2C12) を播種して 1 day 培養した。続いて、共焦点顕微鏡 (Nikon, A1R) で視野内の単一細胞領域の基材を 561 nm の可視光レーザーで刺激し、この際の細胞の接着状態の経時変化を観察した。

## 【結果と考察】

ジブロック共重合体のモノマーユニット数は SPMA/EMA/PEG = 10/40/45 となった。また、分子量  $M_n = 10800$ 、PDI = 1.10 となり、鎖長の制御された高分子が合成できた (Figure 1A)。この EMA 導入高分子から作製したナノ薄膜基材は、従来の MMA 導入高分子と比較して、細胞接脱着を光制御する機能を再現性良くより安定に発現した。続いて、この基材上で単一細胞を判別できる密度で C2C12 を培養し、共焦点顕微鏡を用いて単一細胞の領域に対し 561 nm の可視光レーザーを照射した。その結果、照射領域の細胞はおよそ 20 min 分で隣接細胞との結合を振り切り収縮し始め、40 min 後には完全に剥離した (Figure 1B)。この経時観察において、光未照射領域の細胞は接着し続け、高分子未修飾基板では光照射をしても細胞は剥離しなかった。この結果より、本 P(SPMA-*r*-EMA)-*b*-PEG ナノ薄膜基材は、単一細胞レベルでの細胞脱着が可能であることが示めされた。

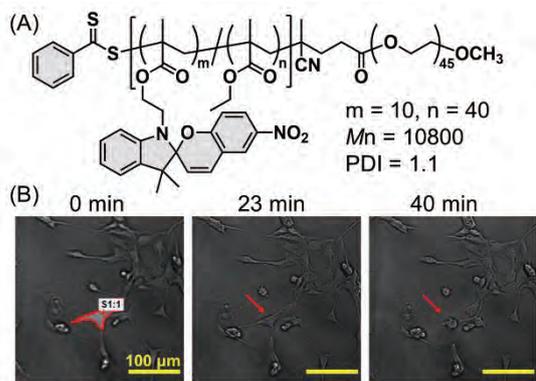


Figure 1. (A) Structure of the P(SPMA-*r*-EMA)-*b*-PEG. (B) Single cell detachment by visible light stimulus.

### Development of polymer nano film-immobilized substrate controlling single cell detachment by focused visible light irradiation

Mitsuya YAMAMOTO, Keiichi IMATO, Naoya TAKEDA

Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University (TWIns)

Tel: +81-3-5369-7323, Fax: +81-3-5369-7323, E-mail: [ntakeda@waseda.jp](mailto:ntakeda@waseda.jp)

## ポリマーを用いたバイオ由来素材の組織化と微細構造の制御

<sup>1</sup> 慶應義塾大学大学院理工学研究科

○南 裕之<sup>1</sup>, 福井 有香<sup>1</sup>, 藤本 啓二<sup>1</sup>

【緒言】われわれは生体が自ら作り出す構造をマテリアルと捉えて、組織工学的手法をマテリアル創製へと展開する「組織マテリアル工学」を提唱している。本研究では、バイオ由来素材として、細胞に加えて脂質由来のリポソームを選択し、ポリマーとの複合化により組織体の構築を行った。ポリマーとしては、Chitosan(CHI)およびイガイ類の粘着タンパク質に含まれるカテコール類である 3,4-Dihydroxyphenylalanine(DOPA)を固定化したポリマーを選択し、これらと細胞およびリポソームとの複合化を行った。その際、環境条件を変化させることによって組織体の微細構造制御を試みた。これらはバイオ由来素材を組織化によって機能材料へと導く技術であり、ここではカテコール由来の反応性と接着性を有する細胞足場材料の構築を目指した。

【実験】DOPA ポリマーを作製するために、まずラジカル重合によって Poly(*p*-nitrophenyl acrylate) (PNPA)を合成した。さらに、DOPA のアミノ基を PNPA の反応性部位に反応させ、残存した反応性部位の加水分解を行った(PNPA-D-COOH)。一方、アニオン性リポソーム(Lipo)を作製し、CHI の吸着を行い(Lipo-CHI)、粒径と表面電位の測定を行った。次に、Lipo-CHI の分散液と PNPA-D-COOH の水溶液を順に Perfluoroalkoxy alkane(PFA) 基板に滴下し、イオンコンプレックス形成と乾燥による組織化を行った。この際、Lipo-CHI 濃度、pH などを調節することで組織体の微細構造制御を行った。さらに、酸化剤を添加することで、カテコール間のキノン架橋形成を促し、組織体の固定化を行った。同様に、細胞(ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、HUVEC)に CHI を被覆し(Cell-CHI)、続いて PNPA-D-COOH を用いて組織体の構築を試みた。得られた組織体については、走査型電子顕微鏡(SEM)によって形状観察を行った。次に、細胞足場材料への応用を見据えて、組織体に対して HUVEC を播種し、光学顕微鏡(OM)による形態観察と、BCECF によって生細胞を蛍光染色して観察を行った。

【結果と考察】分子量が 12000 の PNPA に対し、全活性エステル基の約 23% に DOPA を固定化したポリマー(PNPA-D-COOH)を作製した。また、粒径約 200 nm の Lipo に CHI を単層吸着(35 ng/cm<sup>2</sup>)させることによって Lipo-CHI を作製した。Lipo-CHI の表面電位は pH 3.0 では+45.4 mV、pH 7.4 では+1.82 mV となった。pH 3.0 で PNPA-D-COOH と Lipo-CHI を混合したところ、密に充填された組織体を得られた。一方、pH 7.4 にして PNPA-D-COOH との静電相互作用を弱めたところ、Fig. 1(a)に示すようなポーラス組織体を得られた。さらに、このポーラス組織体を崩壊させて(クラスター化)、pH を変化させることで集積状態を調節し、ポアサイズを変化させることができた。また、カテコール部をキノン架橋することにより、基板から剥離したフリースタANDINGな Lipo 由来組織体を得られた。

同様に、細胞由来の Cell-CHI と PNPA-D-COOH を混合し、pH によって Cell-CHI の集積状態を調節することができた。pH 7.4 では細胞スケールの凹凸構造を有する組織体(Fig. 1(b))が得られ、pH 3.0 にするとネットワーク化した組織体を得られた。さらに、この組織体をキノン架橋することで、フリースタANDINGな細胞由来組織体を得ることができた。

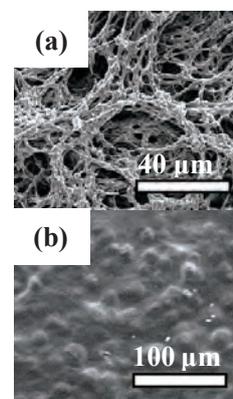


Fig.1 Bio-scaffolds assembled from (a) Lipo-CHI and (b) Cell-CHI with the assistance of PNPA-D-COOH.

### Construction of bio-scaffolds by polymer-assisted assembly from cells or liposomes

Hiroyuki Minami<sup>1</sup>, Yuuka Fukui<sup>1</sup>, Keiji Fujimoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Technology, Keio University

Tel: 045-566-1839, Fax: 045-566-1839, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

## ムチンのポリマーグラフト化とバイオコーティング材料への応用

慶應義塾大学大学院 理工学研究科 基礎理工学専攻  
○徳生ひかる・福井有香・藤本啓二

【緒言】ムチンは、唾液、涙液、胃液などの粘液に含まれる糖タンパク質であり、呼吸器官、消化器官などの内壁を覆うことで、それらを保護する役割を担っている。構造としては、ポリペプチド主鎖にシアル酸と硫酸基を含む糖鎖がブラシ状に結合しており、抗菌性、保水性、ゲル形成能などの機能を有している。本研究では、ムチンに更なる物性と機能を付与するためにポリマー鎖をグラフト化し、機能性コーティング材料への応用を試みた。すなわち、グラフト化ムチンの基材表面における集積・膜形成・付着・表面層形成について検討を行い、濡れ性、吸着性など表面特性の制御、内封物質の保持・放出性の制御など機能発現を目指した。

【実験】ブタ胃由来のムチンを尿素によって可溶化し、続いてアルカリ処理を行うことで糖鎖のトリミングを行った。この改質ムチンにリビング重合開始部位である *iniferter* 基を導入するために、縮合剤の DMT-MM を用いて *N,N*-Diethyldithiocarbamide acetic acid (DCAA) をムチンのアミノ基と反応させて、*iniferter* 化ムチン(Mucin-*i*)を作製した。UV-Vis 測定と FT-IR 測定によって、*iniferter* 基の導入を確認した。有機酸(Ibuprofen sodium salt, IBUNa)を含んだ Mucin-*i* の水溶液に、モノマーである 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) を加え、高圧水銀灯(400W)を用いて UV 照射することでグラフト重合を行った (Mucin-g-PHEMA)。透析によって IBUNa を除去することで、粒子化を促し、動的光散乱(DLS)による粒径測定、表面電位測定および透過型電子顕微鏡(TEM)を用いた形状観察を行った。作製した Mucin-g-PHEMA 粒子を、種々の基板上に滴下して、乾燥させることでコーティング膜を形成させた。さらに、ムチンの熱変性温度と PHEMA のガラス転移温度を考慮して熱処理を施し、コーティング層の強化を試みた。コーティングの評価として、走査型電子顕微鏡(SEM)による形状観察、接触角測定、および X 線光電子分光(XPS)による表面分析を行った。

【結果と考察】未処理のムチン(Mucin<sub>0</sub>)と糖鎖トリミング率 70%のムチン(Mucin<sub>70</sub>)への *iniferter* 基の導入は DMT-MM 量によって調節できた。以下では、Mucin<sub>0</sub>-*i* (導入率:18.0%)と Mucin<sub>70</sub>-*i* (導入率:49.8%)を用いて HEMA のグラフト重合を行った。得られた Mucin-g-PHEMA は IBUNa 濃度に応答して溶解状態が変化し、透析によって IBUNa を除去すると粒子が生成した。この際、グラフト化ムチンの濃度、PHEMA の鎖長と密度などによって粒径を調節することができた。Mucin-g-PHEMA 粒子の表面電位は負を示し、ムチンが粒子表面を覆って分散安定効果を発現していると考えられる。次に、粒子分散液をコーティングしたところ、乾燥とともに粒子間で会合・融着が進み、粒子が密に充填されて表面を均一に覆うことがわかった。ムチンのみではコーティング層は形成されなかった。接触角を測定したところ、コーティングにより基材表面は親水化した。また、糖鎖のトリミング率が高いほど、コーティング膜の接触角が高くなった。さらに、基板の特性によってムチンの分布が変化することがわかった。次に、後処理として熱処理を施したところ、基板への接着性と耐水性を向上させることができた。以上、種々の生物学的機能を有するバイオ素材であるムチンにポリマーグラフト鎖を導入することによって、粒子など構造形成能とともにコーティング能を付与することができた。

---

**Bio-coating over the Surface by Film-forming of Polymer-grafted Mucin**

Hikaru TOKUSEI, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO

Graduate School of Science and Technology, Keio University

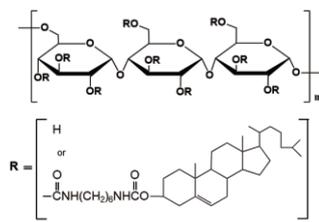
Tel: 045-556-1580, Fax: 045-566-1551, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

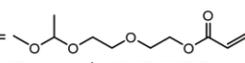
## 生分解性ナノゲル架橋ポーラスゲル材料の設計と機能評価

京都大学大学院工学研究科

○廣瀬 諒, 澤田 晋一, 向井 貞篤, 佐々木 善浩, 秋吉 一成

【緒言】近年注目が集まる再生医療では、組織再生の空間確保とともにその組織の形状を維持・制御し、細胞の増殖・分化を助ける足場材料が必要とされている。この足場材料には生分解性、生体適合性、成形性、多孔性などの特性が要求される。当研究室では天然由来の水溶性多糖であるプルランにコレステリル基をわずかに導入したコレステリル基置換プルラン (CHP) が水中でナノゲルを形成することを見出している。また、このナノゲルをユニットとしたナノゲル集積材料の開発を行っており、反応性官能基修飾ナノゲルと架橋剤から作製したナノゲル架橋ゲルを凍結融解することでナノゲル架橋ポーラスゲルが得られることを報告してきた[1]。このナノゲル架橋ゲルやそのポーラスゲルは、中性条件下では数十日で架橋部位の加水分解が進行し、ナノゲルが放出される。今後、このゲルを再生医療用足場材料として展開する際、この分解速度の制御が極めて重要である。本研究では、CHP ナノゲル中の反応性基であるアクリロイル基と CHP とのリンカー部位に着目し、生分解性を有する結合を導入した新規反応性 CHP を設計、合成した。この新規反応性 CHP から作製したナノゲル架橋ポーラスゲルについて、そのポーラス構造について検討するとともに、ゲルの分解挙動について検討した。



CHPA: R = , CHPVEEA: R =  +  
Fig.1 Chemical structure of CHPA and CHPVEEA

【実験】 *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

を用い、縮合反応によりアクリル酸を CHP に反応させ、アクリロイル基置換 CHP(CHPA) (Fig.1) を合成した。また CHP に *p*-toluenesulfonic acid を触媒としてアクリロイル基とビニルエーテル基を併せ持つ 2-(2-Vinylxyethoxy)ethyl acrylate(VEEA)を反応させ、酸分解性アセタール基を有する VEEA 置換 CHP(CHPVEEA) (Fig.1) を合成した。アクリロイル基の導入率は <sup>1</sup>H-NMR 測定より算出した。得られた CHPA、CHPVEEA を PBS (pH7.4) に溶解させ、4 本鎖 PEG-SH 溶液と、アクリロイル基とチオール基のモル比が等しくなるように混合し、マイケル付加反応によりナノゲル架橋ゲルを作製した。次に、得られたゲルを凍結融解処理してナノゲル架橋ポーラスゲルを作製した。同様に蛍光標識したナノゲル架橋ポーラスゲルも作製し、ゲル内部構造を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。続いてこれらのナノゲル架橋ポーラスゲルの分解における pH 依存性を、分解放出されたナノゲルに由来する糖濃度を測定して検討した。

【結果と考察】アクリル酸の反応量を変えることで、100 単糖当たりのアクリロイル基がそれぞれ 10 個、15 個、20 個導入された CHPA の合成が確認された。また、100 単糖当たり VEEA が 20 個導入された CHPVEEA が得られた。それぞれ、ナノゲル架橋ポーラスゲルを作製し、共焦点レーザー顕微鏡観察したところ、CHPA ナノゲル架橋ポーラスゲルはアクリロイル基導入率が高いほどゲルのポアサイズが小さくなる傾向が見られた。次に、ナノゲル架橋ポーラスゲルの分解挙動を検討した結果、CHPA ナノゲル架橋ポーラスゲルからのナノゲル放出速度 (分解速度) は pH が高い条件では上昇し、中性付近では数日間でゲルが分解した。一方、CHPVEEA ナノゲル架橋ポーラスゲルの分解速度は、リンカーのアセタール基の酸分解性のために pH が低下するに従い上昇することが確認された。以上の結果から、アクリロイル基と CHP との連結部位の構造を変えることでナノゲル架橋ポーラスゲルの分解速度やその特性を制御し得ることが明らかとなった。

[1] Hashimoto, Y.; Mukai, S.; Sawada S.; Sasaki, Y.; Akiyoshi, K. *Biomaterials* **2015**, *37*, 107-115.

#### Design and function of nanogel crosslinked porous gel with biodegradability

Ryo HIROSE, Shin-ichi SAWADA, Sada-atsu MUKAI, Yoshihiro SASAKI, Kazunari AKIYOSHI

Graduate School of Engineering Kyoto University, Department of Polymer Chemistry

Tel: +81-075-383-2589, Fax: +81-075-383-2590, E-mail: hirose.ryo.27x@st.kyoto-u.ac.jp

## 細胞表面の混在分子が細胞間相互作用へ及ぼす影響

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所  
○有馬 祐介, 磯部 潤

【緒言】細胞間接着は、細胞間の情報伝達や多細胞組織形成において重要な過程である。我々は、単鎖 DNA-ポリエチレングリコール脂質複合体(ssDNA-PEG-脂質)によって細胞表面を修飾し、細胞間相互作用の制御を試みてきた。細胞本来または ssDNA-PEG-脂質による人工的な細胞間相互作用いずれも、膜タンパクや糖鎖などが混在している細胞膜間で起こる。がん化など細胞状態の変化に伴い混在する分子の発現が変化すると、細胞間相互作用へも影響すると考えられる。しかし、細胞表面に存在する分子の種類や量が不明確であり、細胞表面に混在する分子が細胞間相互作用へ及ぼす影響を系統的に調べるのは困難である。本研究では、ガラス上に形成した脂質二分子膜（支持脂質二分子膜 (supported lipid bilayer, SLB)）へ ssDNA-PEG-脂質および PEG-脂質を導入し、混在する分子が明確なモデル細胞膜を作製した。混在する PEG-脂質の分子量が ssDNA-PEG-脂質を介した細胞-SLB 間の接着挙動に及ぼす影響を調べた。

【実験】SLB に fluorescein 標識 ssDNA-PEG-脂質 (PEG 分子量 5k) と rhodamine 標識 PEG-脂質 (PEG 分子量 5k, 20k) を導入した。細胞にはヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株(CCRF-CEM)を用い、ssDNA'-PEG-脂質で細胞表面を修飾した。SLB 上へ細胞を播種した後の蛍光像を全反射蛍光顕微鏡で観察し、ssDNA-PEG-脂質と PEG-脂質それぞれの分布を調べた。

【結果と考察】細胞播種前は SLB 全体に蛍光分子が均一に分布していたが、細胞播種後は細胞が接着した箇所でも ssDNA-PEG-脂質に基づく蛍光は強くなった。この挙動は混在する PEG-脂質の分子量 (5k, 20k) に関わらず観察され、細胞接着に伴い ssDNA-PEG-脂質は細胞-SLB の接着面に集積することが分かった (図 2)。一方、混在分子である PEG-脂質は分子量 5k の場合は細胞接着後も一様に分布しているのに対し、20k の場合は接着部が暗くなり、細胞-SLB の接着面から排除されていることが分かった。さらに、細胞接着部での ssDNA-PEG-脂質由来の蛍光強度を測定したところ、PEG(20k)が混在している方が蛍光強度が高く、ssDNA-PEG-脂質がより集積していることが分かった。これらの結果から、かさ高い PEG-脂質が混在すると、接着に伴い接着面から排除され、ssDNA-PEG-脂質の集積が間接的に増強されることが分かった。

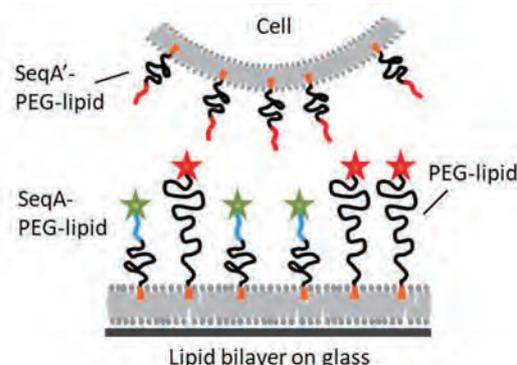


Figure 1. Schematically depicted cell attachment to SLB.

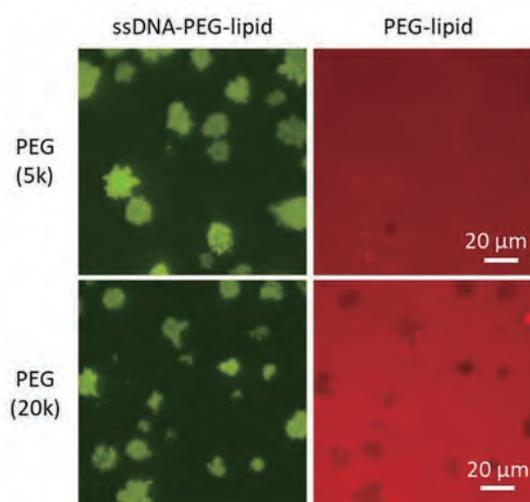


Figure 2. Fluorescence images of SLBs after attachment of CCRF-CEM cells through DNA hybridization.

### Effect of molecular crowding on cell-cell interaction studied using model cell surface

Yusuke Arima, Jun Isobe

Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Tel: +81-75-751-4115, Fax: +81-75-751-4116, E-mail: arima@infront.kyoto-u.ac.jp

## 中性子散乱による中間水の静的・動的構造解析

<sup>1</sup>東レリサーチセンター  
○中田 克<sup>1</sup>

### 【緒言】

医療機器に用いられるポリマー材料界面に存在する“中間水”は生体適合性が発現するための重要因子であると考えられている。しかし、中間水の存在に基づく生体適合性発現メカニズムは未だ解明されておらず、また、中間水の構造的特徴は不明な点が多い。本研究では、生体適合性ポリマーの一つであるポリビニルピロリドン(PVP)について、中性子全散乱や中性子準弾性散乱を用いて、中間水の静的および動的構造解析を行い、中間水の構造的観点から生体適合性発現メカニズムについて調べた。

### 【実験】

PVP 粉末 ( $M_w = 29,000$ ) を  $110\text{ }^\circ\text{C}$  で真空乾燥した絶乾粉末に、軽水および重水を重量比で混合し試料を調製した。調製した含水率は、DSC や  $^2\text{H}$  NMR から求めた中間水量の結果をもとに PVP モノマー単位 ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}$ ) に対して、 $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}/2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )、 $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}/6\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )、および  $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}/9\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) とした。中性子全散乱および準弾性散乱実験は、J-PARC MLF の BL21 (NOVA) と BL02 (DNA) をそれぞれ使用し、 $300\text{ K}$  で測定を行った。

### 【結果と考察】

中性子全散乱実験から得られた PVP 水溶液の静的構造因子  $S(Q)$  では、 $Q = \text{約 } 1.8\text{ \AA}^{-1}$  に水の水素結合構造に由来するピークを観測することができた。このピークは純水において  $Q = 2.0\text{ \AA}^{-1}$  に観測されるものであり、PVP 水溶液中の不凍水や中間水は、純水に比べて水素結合ネットワークが低密度化していることがわかった。水素結合ネットワークの低密度化は、一般的には水素結合の歪が解消され、より秩序化した四面体構造を形成していることを示唆するものである。したがって、PVP 水溶液における不凍水や中間水は、純水に比べて秩序化した水素結合ネットワークを呈していると考えられる。

また、中性子準弾性散乱から得られた動的構造因子  $S(Q, E)$  を解析した結果、低含水率 ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}/2\text{H}_2\text{O}$ ) では、不凍水と中間水がともに PVP のピロリドン環に強く拘束され、ピロリドン環と協同的な緩和運動を呈していることが明らかになった。一方で、含水率が増加した  $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}/9\text{H}_2\text{O}$  では、不凍水は変わらず PVP に拘束されて、PVP と協同的な運動を呈しているが、中間水は PVP からの拘束を離れて拡散運動を呈するようになることがわかった。得られた中間水の拡散係数は  $5.0 \times 10^{-10}\text{ m}^2\text{s}^{-1}$  であり、純水 ( $2.0 \times 10^{-9}\text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) と比べて約  $1/4$  程度遅くなっていると考えられる。

中性子全散乱と中性子準弾性散乱を用いて、PVP 水溶液の不凍水と中間水の静的・動的構造解析を行った結果、PVP に吸着した中間水は以下のような構造的、運動的特徴を有する水であることがわかった。

- 1) 中間水は、秩序化した水素結合ネットワークを形成している。
- 2) 中間水は、緩やかな拡散運動(純水の  $1/4$  程度)を呈している。

したがって、中間水は構造的には不凍水、運動的には純水(自由水)の特徴を併せ持つ水であることが示唆された。このような中間水の特徴によって、タンパク質がポリマー界面に接近した際に、盛んに水が交換することができ、結果としてタンパク質が吸着あるいは変性する前にポリマー界面から離れて拡散するような界面状態となっていると考えられる。

---

### Static and Dynamic Structural Analysis of Intermediate Water via Neutron Scattering

Masaru Nakada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Toray Research Center, Inc.

Tel: +81-77-533-8608, Fax: +81-77-533-8696, E-mail: [masaru\\_nakada@trc.toray.co.jp](mailto:masaru_nakada@trc.toray.co.jp)

## 刺激応答性リンクル薄膜によるハイドロゲルの接着制御

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科

○加藤 雅俊<sup>1</sup>, 麻生 隆彬<sup>1</sup>, 宇山 浩<sup>1</sup>

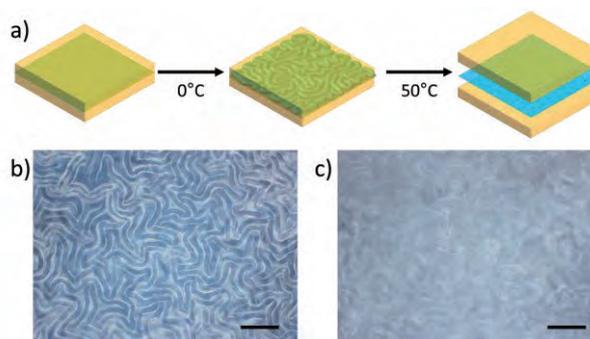
【緒言】生体軟組織を含むソフトマテリアルの接着・接合技術が幅広く研究されている。我々は、ハイドロゲルの接着を検討する中で、強固に接着するゲルとゲルの界面にリンクル構造が形成することを見出した<sup>1</sup>。リンクル構造は自然界、とりわけ弾性体の表面や界面によく観察されることから、我々はリンクル構造の弾性体を強固に接着する可能性に着目した。ハイドロゲル接着界面のリンクル構造を利用した新規なソフトマテリアルの接着制御法を開発できると考えた。そこで本研究では、リンクル構造形成を外部刺激で制御可能なハイドロゲルの接着制御について検討した。

【実験】カチオン性高分子またはアニオン性高分子存在下でポリビニルアルコール (PVA) を架橋することで、それぞれカチオン性ゲルとアニオン性ゲル薄膜を作製し、実験に用いた。ゲル薄膜は貧溶媒を用いて収縮、続いて減圧乾燥し、乾燥薄膜とした。接着は乾燥薄膜をハイドロゲルの間に挟み込み、実施した。接着および接着界面の評価は位相差顕微鏡による構造観察と、引っ張り試験による接着強度測定により実施した。

【結果と考察】ゲル薄膜を貧溶媒中で収縮させて乾燥させた薄膜 A と、基板上で乾燥させた薄膜 B を用いてゲルを接着した。いずれを用いてもゲルは接着した。接着界面は透明であったが、位相差顕微鏡観察では薄膜 A を用いた場合にのみリンクル構造が認められた。リンクル構造を形成した場合にのみゲルが破断するほどに強固に接着することが接着強度測定から明らかになった。乾燥薄膜のゲル界面での水への膨潤挙動を考えると、薄膜 A は接着面に対し水平方向へ膨潤するが、薄膜 B は垂直方向にのみ膨潤する。したがって水平方向に薄膜が膨潤することがリンクル形成と強固な接着に重要であるとわかった。

薄膜の膨潤を駆動力としたリンクル構造の形成によりゲルが強固に接着するならば、刺激応答性薄膜を用いてリンクル構造を解消させることで接着強度を低下させ、ゲルの剥離が可能になると考えた。そこで、ゲル薄膜とアセトアルデヒドを反応させ、PVA を疎水性化することで温度応答性薄膜を作製した。予め加温することで収縮させた温度応答性薄膜をゲルで挟み込み、冷却すると薄膜は膨潤してリンクル構造を形成し、ゲルどうしを接着できた。興味深いことに、この接着ゲルを加温するとリンクル構造は消失し、簡便にゲルを剥離することができた (Fig. 1)。刺激応答性薄膜を利用した膨潤収縮を駆動力として接着界面のリンクル構造の形成や解消を制御することで、ゲルどうしの接着制御を実施することができた。今後、生体軟組織の簡便な接手法としての展開が期待される。

【参考文献】 (1): Kato. M.; Tsuboi. Y.; Kikuchi. A.; Asoh. T. *J. Phys. Chem. B*, **2016**, *120*, 5042.



**Fig. 1.** (a) Adhesion control of hydrogels utilizing stimuli-responsive wrinkling film. (b, c) Microscopic observation of (b) before and (c) after heating for adhered gel-gel interface, respectively. All scale bars indicate 500  $\mu\text{m}$ .

### Hydrogel adhesion utilizing stimuli-responsive wrinkling film

Masatoshi Kato<sup>1</sup>, Taka-Aki Asoh<sup>1</sup>, Hiroshi Uyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Osaka University

TEL: +81-6-6879-7365, FAX: +81-6-6879-7367, E-mail: m\_kato@chem.eng.osaka-u.ac.jp

## 皮膚の完全再生を目指したゲル状組織再生材の開発

<sup>1</sup>甲南大学大学院 FIRST, <sup>2</sup>甲南大学 FIRST  
○小野 公佳<sup>1</sup>, 長濱 宏治<sup>2</sup>

【緒言】皮膚は表皮・真皮・皮下組織からなる階層構造を形成している (Figure 1)。各層には多種類の細胞が存在し、それらが細胞間で相互作用しながら規則的に組織化することで、毛包・分泌腺・汗腺などの付属器が構築され、多機能な皮膚がつくられる。つまり、損傷した皮膚を完全に再生するためには、付属器を含めた階層構造の再建が求められるため、その手法として、皮膚に存在する様々な細胞に対して足場となる材料を用いる組織工学が有効だと考えられる。本研究ではこれまでに、生分解性ポリマーの PLGA-PEG-PLGA とクレイナノ粒子である LAPONITE を複合したゲルを開発した。このゲルは、体内で PLGA-PEG-PLGA が加水分解されゲルから溶出すると同時に、LAPONITE が周囲のタンパク質 (細胞外基質や増殖因子など) をゲル内に取り込み (自己補給し)、最終的には補給したタンパク質を成分とするゲルに成分置換される。私たちはこのゲルを自己補給ゲルと呼んでいる。私たちは、自己補給ゲルの長が皮膚組織の完全再生に有用であると仮説を立て、本研究では自己補給ゲルを用いた皮膚組織の完全再生を試みた。

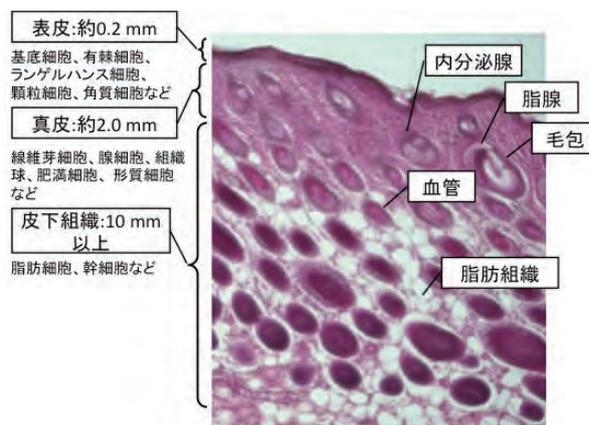


Figure 1. Tissue section of normal mouse skin stained by H&E method.

【実験】*In vitro* 実験において、ゲルの細胞足場としての機能を調べるため、ゲル上に幹細胞、上皮細胞、線維芽細胞、間葉系細胞など様々な細胞を播種し、接着・伸展・増殖を共焦点顕微鏡により調べた。*In vivo* 実験では、マウスの背面部分に 7 mm 角の表皮から皮下組織にわたる傷を作製し、ゲルを塗布したのち経過観察し、創傷面積の縮小を解析した。また、組織切片を作製し、炎症反応や再建した皮膚組織の組織学的解析を行った。この際、PLGA-PEG-PLGA 単独ゲルをネガティブコントロール、市販されている皮膚創傷に対する治療材をポジティブコントロールとして用いた。また、さらに途中経過での組織切片を作製し、途中経過における組織学的解析を行った。

【結果と考察】表皮、真皮、皮下組織の細胞および付属器に含まれる細胞をそれぞれ自己補給ゲル上で培養したところ、全ての細胞で接着・伸展、増殖が見られたことより、このゲルは皮膚組織に含まれる多様な細胞に対して足場として機能することが分かった。自己補給ゲルを用いて処置した皮膚創傷マウスでは、肉芽形成が初期段階から観察され、効果的に創傷縮小が起こった。また、再建された皮膚には血管、毛包、分泌腺など付属器も見られたものの、皮下脂肪組織は正常皮膚よりも薄いものであった。また、途中経過での組織切片の解析から、自己補給ゲルでは、ゲルが足場となることで初期段階から線維芽細胞の遊走が起こり、傷が閉じる期間が短縮されることがわかった。このことから、自己補給ゲルは皮膚組織の完全再生技術を開発する上で有用な基盤材料であることが示された。

### Development of hydrogel-based tissue regenerative materials for whole skin tissue regeneration

Kimika ONO<sup>1</sup> and Koji NAGAHAMA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate school of Nanobiochemistry, Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University, Kobe 650-0047, Japan. <sup>2</sup>Department of Nanobiochemistry, FIRST, Konan University, Japan

Tel: 078-303-1328, Fax: 078-303-1495, e-mail: nagahama@center.konan-u.ac.jp

## アゾベンゼン基導入 UCST 型ウレイド高分子の相分離挙動の光制御

<sup>1</sup>東京工業大学生命理工学院、<sup>2</sup>名古屋大学大学院工学研究科  
 ○嶋田 直彦<sup>1</sup>, 池内 尚<sup>1</sup>, 村山 恵司<sup>2</sup>, 浅沼 浩之<sup>2</sup>, 丸山 厚<sup>1</sup>

## 【緒言】

我々は、ウレイド基を有する高分子が生理的条件下において、コアセルベート滴形成を伴う上限臨界溶液温度(UCST)型の温度応答性を示すことを見出した。相転移温度( $T_p$ )は分子量や分子構造を変えることで4-65°Cの広範囲においてコントロールすることが可能であった。我々は、この生理的条件下における UCST 型挙動に基づいた温度刺激によるタンパク質分離や細胞培養形態制御への応用を行ってきた。しかし、温度刺激は生体分子や細胞にとって侵襲的であり、応用範囲が限定的になっていた。本研究ではより非侵襲的な光刺激によるウレイド高分子の相転移とその機能制御を目的とした。光官能基であるアゾベンゼン基を導入したウレイド高分子を合成し、光応答性について報告する。

## 【実験】

ポリビニルアミン( $M_w = 150 \times 10^3$ )にシアン酸カリウムを添加することでウレイド基が92 mol%導入されたポリビニルアミン-co-ビニルウレア(PVU)を調製した。PVU に光応答性分子である4-(phenylazo)benzoic acid または 2,6-dimethyl-4-(methylthio) azobenzene-4'-carboxylic acid を加え縮合を行い、アゾベンゼンが導入された PVU (Azo-PVU, SDMAzo-PVU, Fig. 1)を合成した。ポリマー溶液(1.0 mg/mL in 10 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 150 mM NaCl) に対して UV 光(372 nm)あるいは Vis 光(404 or 453 nm)を2分間照射した後、様々な温度において透過率を測定した。

## 【結果と考察】

ポリマー溶液の透過率の温度依存性を測定した。Azo-PVU、SDMAzo-PVU 溶液は共に高温側で透過率が高く溶解しているが、温度の低下に伴い、ある温度で急激に透過率が低くなった。この結果より、両ポリマーは UCST 型挙動を示すことが確認された。次に、 $T_p$  の変化を調べた。Azo-PVU 溶液は UV 照射後と 453 nm の光照射後では透過率曲線に差が生じた(Fig. 2)。453nm の光照射後で  $T_p$  が 41°C に対し UV 照射後では 32°C に低下した。これは導入されたアゾベンゼンが UV の光照射によってシス体となり極性が大きくなったためであると考えられる。また、SDMAzo-PVU 溶液は可視光(404 nm)の照射においてもシス体への異性化が生じ、 $T_p$  が 32°C から 27°C へと低下した。以上から、アゾベンゼン基を導入したウレイド高分子は侵襲性の少ない光刺激によって相転移を制御可能なバイオマテリアルとして期待される。

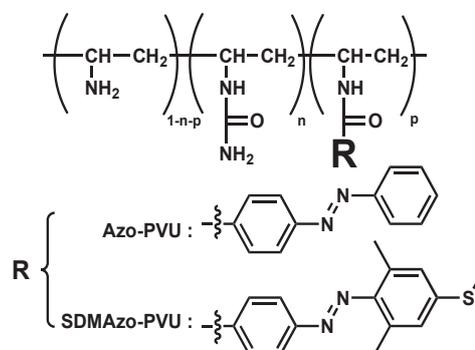


Fig. 1 Structural formulas of PVUs modified with azobenzene derivatives (Azo-PVU, SDMAzo-PVU)

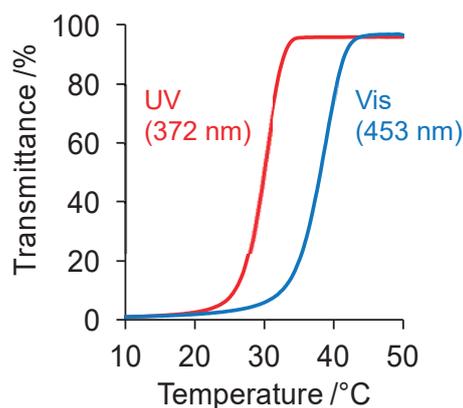


Fig. 2 Transmittance curves of UV(372 nm)- or Vis(453 nm)-irradiated Azo-PVU.

## Design of photo-responsive ureido polymers containing azobenzene moieties

Naohiko Shimada<sup>1</sup>, Nao Ikeuchi<sup>1</sup>, Keiji Murayama<sup>2</sup>, Hiroyuki Asanuma<sup>2</sup>, Atsushi Maruyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

<sup>2</sup> School of engineering, Nagoya University

Tel: +81-45-924-5762, Fax: +81-45-924-5762, E-mail: [amaruyama@bio.titech.ac.jp](mailto:amaruyama@bio.titech.ac.jp)

## コラーゲングルへの OVA 分泌ペプチドの添加がゲル物性や細胞接着性に与える影響

<sup>1</sup>大阪府立大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

○児島 千恵<sup>1</sup>, 中嶋 悠介<sup>1</sup>, 成田 侑祐里<sup>2</sup>, 森本 直也<sup>2</sup>, 外川 大起<sup>2</sup>, 和久 友則<sup>2</sup>, 田中 直毅<sup>1</sup>

### 【緒言】

コラーゲンは細胞外マトリックス (ECM) の主成分であり、生体内の細胞環境を模倣した細胞培養基材として利用されている。近年、細胞の増殖、分化、形態変化は周囲の化学的性質や力学的性質に依存することが明らかになっており、それぞれの細胞培養に適した細胞足場材料の開発が求められている。オボアルブミン (OVA) は卵白の主成分であり、食品業界では OVA を機能性材料に展開しようとする試みがなされている。OVA の N 末端 (1-22) には分泌シグナル配列が存在する。田中らは、これまでの研究で、このペプチドが OVA などの蛋白質の熱凝集を促進すること、加熱によって繊維状の凝集物を形成することを明らかにしてきた[1]。本研究では、この OVA 分泌ペプチド (pN1-22) をコラーゲングルに添加し、ゲル物性に与える影響について検討した[2]。さらに、pN1-22 を添加したコラーゲングル (OVA-Col) 上で様々な細胞を培養し、pN1-22 が細胞接着性に与える影響について検討した。

### 【実験】

OVA ペプチド (pN1-22) を添加した前後でコラーゲングルの粘弾性測定、透過型電子顕微鏡によるコラーゲン繊維構造の観察、動的光散乱法 (DLS) によるゲル網目構造の推定、接触角測定を行った。また、これらのゲル上で、マウス正常線維芽細胞 (NIH3T3 細胞)、ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞)、マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞)、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7 細胞)、イヌ腎尿細管上皮細胞細胞 (MDCK 細胞) を培養し、細胞接着性について検討した。NIH3T3 細胞については、ビンキュリン抗体による免疫染色法で細胞の接着斑を観察した。

### 【結果と考察】

pN1-22 を添加したコラーゲングルでは、ゲル化・コラーゲン線維形成が促進し、ゲルが硬くなり、コラーゲングル表面が親水性となることが明らかになった。NIH3T3 細胞を pN1-22 添加コラーゲングル上で培養したところ、細胞接着数の減少と細胞の伸展の抑制がみられた。免疫染色法によって細胞の接着斑を観察したところ、pN1-22 を添加したコラーゲン上の細胞では、接着斑が観察されなかった。接着斑はインテグリンの裏打ちタンパク質の集積体であることから pN1-22 はインテグリン接着を抑制していることが示唆された。

次に、様々な細胞を培養し、細胞接着性や細胞の形態を観察した。RAW264.7 細胞はほとんどコラーゲングルに接着せず、増殖もしなかったが、HeLa 細胞と MC3T3-E1 細胞はコラーゲングル上に接着し、培養することができた。これは、それぞれの細胞が発現しているインテグリンの種類の違いが影響していると考えられる。また、MDCK 細胞はコラーゲン存在下では、上皮細胞特有の細胞シートを形成せず、上皮間葉転移を生じて、繊維芽細胞のように細胞が伸展するが、高濃度の pN1-22 を添加したコラーゲングルでは MDCK 細胞の細胞シートの形成が見られた。これは、pN1-22 は、コラーゲンが誘発する上皮間葉転移が阻害できることを示唆するものである。

[1] Y. Kawachi, R. Kameyama, A. Handa, N. Takahashi, N. Tanaka, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 8868 (2013).

[2] C. Kojima, Y. Narita, T. Waku, N. Morimoto, D. Togawa, N. Takahashi, A. Handa, N. Tanaka, *Chem. Lett.*, 46, 395 (2017).

---

### Impacts of Ovalbumin Secretory Peptide in Collagen Gel to Hydrogel Properties and Cell Adhesion

Chie Kojima<sup>1</sup>, Yusuke Nakajima<sup>1</sup>, Yuri Narita<sup>2</sup>, Naoya Morimoto<sup>2</sup>, Daiki Togawa<sup>2</sup>, Tomonori Waku<sup>2</sup>, Naoki Tanaka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University; <sup>2</sup>Faculty of Molecular Chemistry and Engineering, Kyoto Institute of Technology,

Address: 1-2 Gakuen-cho Naka-ku Sakai-city Osaka 599-8570

Phone&Fax. +81-72-254-8190, E-mail. kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

## 脱細胞化血管の内腔表面形状を有する PDMS レプリカの創製

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, <sup>2</sup>大阪工業大学 工学部 生命工学科,<sup>3</sup>芝浦工業大学 システム理工学部 生命工学科○木村 剛<sup>1</sup>, 近藤 真由香<sup>1</sup>, 橋本 良秀<sup>1</sup>, 藤里 俊哉<sup>2</sup>, 中村 奈緒子<sup>3</sup>, 岸田 晶夫<sup>1</sup>

【緒言】 上皮（内皮）細胞と結合組織の間に存在する基底膜は、細胞機能を制御する上で重要である。生体組織より抽出した基底膜成分の同定やそれを用いた細胞機能への影響などの基底膜成分が研究の主流となっている。しかし、基底膜特有の形状が失われている。表面形状と細胞機能については、規格化されたナノ・マイクロスケールのグループ構造やパターン構造などの細胞機能に関する研究が数多くなされている。これは、細胞機能への形状的要素に関する知見は得られるが、生体組織本来の表面形状を有するものではない。近年、生体組織から細胞を除去した脱細胞化生体組織は、生体組織の構造や多様な ECM 成分を有する等の特徴を有し、高い生体適合性、機能性を発現することから注目されている。我々は、高静水圧法（HHP 法）にて得られた脱細胞化血管にて内皮細胞の早期被覆と高い生体適合性を報告してきた。この一つの要因として、血管内腔の表面形状が生体に許容されるものであったと推察している。本研究では、適切な脱細胞化された脱細胞化組織が基底膜を有するとの仮説のもと、異なる脱細胞化法（HHP 法、界面活性剤法）にて得られた脱細胞化大動脈の表面形状、そこでの細胞挙動を調査し、基底膜表面形状の細胞挙動への影響について検討した。さらに、脱細胞化大動脈を 1 次鋳型（モールド）とし、ポリジメチルシロキサン（PDMS）樹脂を流し込んだ後に硬化させて表面形状を転写し、そのモールドを 2 次鋳型として大動脈 PDMS レプリカを創製し、新しい機能材料としての評価を行った。

【実験】ブタ大動脈に HHP 処理および界面活性剤法（SDS）処理を施し、脱細胞化大動脈を調製し、化学固定化・凍結乾燥後に鋳型として用いた。PDMS 樹脂を流し込んだ後に硬化させて表面形状を転写し、それを鋳型としてレプリカを得た。SEM 観察、3D レーザー顕微鏡観察にて表面形状の評価を行った。繊維芽細胞（NIH3T3）、血管内皮細胞（HUVEC）を各脱細胞化血管、レプリカに播種し、蛍光染色によって細胞の形態を観察し、得られた画像から細胞の配向および進展を解析した。

【結果と考察】HHP 脱細胞化血管では、微細なコラーゲン繊維からなるメッシュ状の構造が観察され（Fig. 1A）、生体血管と同様の長軸方向に筋状の起伏が観察された。一方、SDS 脱細胞化血管では、メッシュ形状および長軸方向への隆起は消失し、平坦な表面であった（Fig. 1B）。脱細胞化処理方法により表面形状が異なることが明らかとなった。レプリカでは、脱細胞化処理法による表面形状の違いが写し取れていた（Fig. 1C, 1D）。脱細胞化血管およびレプリカ上に細胞を播種・培養し、形態および配向を評価した。NIH3T3 は、HHP 脱細胞化血管にて血管長軸に沿って配向し、高いアスペクト比の紡錘形態を示した。HHP レプリカにおいても配向度の高い進展接着が示された。一方、平坦 PDMS および SDS レプリカではランダムな向きの進展接着であった（Fig. 2）。

HUVEC は、HHP 脱細胞化血管および HHP レプリカで血管長軸に沿った配向度の高い細胞接着が示されたが、平坦 PDMS、SDS レプリカでは細胞の配向は示されなかった。以上より、細胞形態に表面形状が強く影響することが示され、また、血管内腔形状が特徴的機能を有することが明らかになった。さらに、生体組織の表面形状を合成材料に複製することが可能であり、血液接触デバイスの表面加工法としての可能性が期待される。

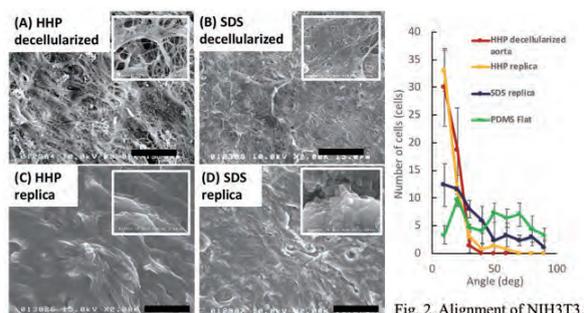


Fig. 1. SEM observation of various surface.

Fig. 2. Alignment of NIH3T3.

## Preparation of a synthetic replica having surface morphology of decellularized aortic lumen

Tsuayoshi Kimura<sup>1</sup>, Mayuka Kondo<sup>1</sup>, Yoshihide Hashimoto<sup>1</sup>, Toshiya Fujisato<sup>2</sup>, Naoko Nakamura<sup>3</sup>, Akio Kishida<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University. <sup>2</sup>Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, <sup>3</sup> Department of Bioscience and Engineering, Shibaura Institute of Technology

Tel: +81-3-5280-8110, Fax: +81-3-5280-8005, E-mail: kimurat.mbme@tmd.ac.jp

## Improved endothelization of anti-platelet medical ePTFE by peptide immobilization

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute  
 Yihua Liu<sup>1</sup>, Maria Chiara Munisso<sup>1</sup>, Atsushi Mahara<sup>1</sup>, Yusuke Kambe<sup>1</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>1</sup>

**【Introduction】** The merit of mechanical heart valves is to avoid the risk of re-operation. They can be used for lifetime in company with anticoagulant medication. In our laboratory, the polymeric mechanical heart valves with surface modified poly(ether-ether-ketone) (PEEK) have been designed. Unfortunately, insufficient blood compatibility of the medical expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) sewing cuff was unsatisfying with antithrombotic capacity in the preclinical tests. Thus, in our previous research, a glycidyl methacrylate (GMA)-anchored grafting method was established to modify the chemically inert medical ePTFE with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer to achieve anti-platelet property<sup>1</sup>. However, only anti-platelet property is not enough for antithrombogenicity during long-term implantation.

Therefore, the purpose of this study is to improve endothelization of the anti-platelet ePTFE sewing cuff. Herein, the endothelization was achieved by immobilizing endothelial cell selective peptides (the well-known REDV, and our new haem compatible peptide-1 (HCP-1)) to ePTFE surface based on GMA-anchored grafting method. Methacrylic acid (MAA) with carboxyl group was employed as the functional monomer to react with peptides.

**【Experiment】** Firstly, ePTFE was treated by Ar plasma and exposed in the air. Next, the ePTFE was reacted in 0.1 mol/L GMA/ethanol (EtOH) solution at 65°C for 24 h. Then, MPC/MAA (90/10 mol%/mol%) was dissolved in EtOH at the concentration of 0.5 mol/L with the initiator 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN). The polymerization was performed at 65°C for 24 h. The above modified ePTFE (named ePTFE-A10) immersed in a water solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (WSC) (0.10 mol/L) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (0.05 mol/L) for 30 min at room temperature. Endothelial cell selective peptide REDV or new HCP-1/PBS solution (1 mg/mL) was reacted for 2 h at 37°C. The adhesion of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and platelets on modified ePTFE was evaluated in vitro and in situ.

**【Results and discussion】** In the 2 h porcine closed-circuit system, lots of platelet aggregation was observed on ePTFE. In contrast, the adhesion of platelets on both modified ePTFE was greatly reduced (Figure 1 top). The anti-platelet property of MPC polymer was maintained even after peptides were immobilized. However, ePTFE-A10 not only prevented platelet adhesion, but also resisted HUVEC adhesion. With immobilizing peptides on ePTFE-A10, HUVEC adhered on ePTFE-REDV and ePTFE-HCP-1, and spread much more than on ePTFE after 48 h incubation (Figure 1 bottom). The endothelial cell selective peptides performed well for endothelization

ePTFE modified by GMA-anchored grafting was considered as a candidate for blood contact devices on improving antithrombotic property and endothelization for long-term application.

**【Acknowledgement】** The authors thank Dr. Kyoko Fukazawa and Prof. Kazuhiko Ishihara, School of Engineering, The University of Tokyo, for their constructive discussion. This research was supported by the S-innovation Research Project of Japan Agency for Medical Research and Development (AMED).

**【Reference】** 1. Y. Liu et al., *Biomater. Sci.*, 2018, 6, 1908-1915.

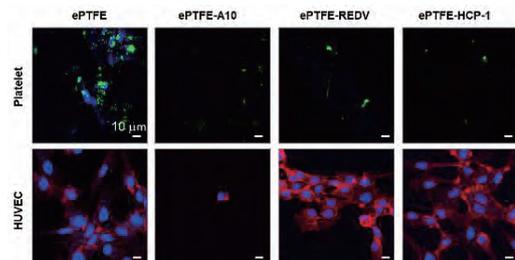


Figure 1. Platelet adhesion by porcine closed-circuit system, and HUVEC adhesion on the ePTFE and modified ePTFE surfaces.

### Improved endothelization of anti-platelet medical ePTFE by peptide immobilization

Yihua Liu<sup>1</sup>, Maria Chiara Munisso<sup>1</sup>, Atsushi Mahara<sup>1</sup>, Yusuke Kambe<sup>1</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute  
 Tel: +81-6-6833-5012 (2637), Fax: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

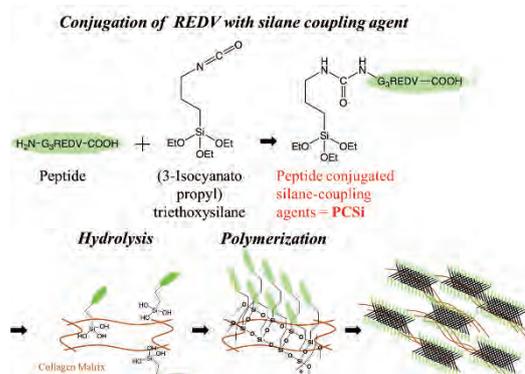
## 抗血小板粘着と血管内皮細胞に対する親和性向上を同時に付与する脱細胞血管修飾剤

<sup>1</sup> 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部, <sup>2</sup> 関西大学化学生命工学部  
○古島 健太郎<sup>1,2</sup>, 馬原 淳<sup>1</sup>, 平野 義明<sup>2</sup>, 山岡 哲二<sup>1</sup>

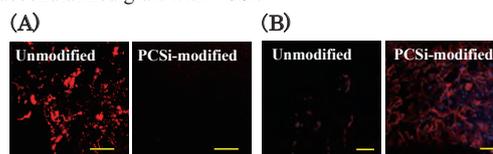
**【緒言】** 小口径人工血管の安定した開存には、血栓形成の抑制と、内皮化形成が必要である。我々は、脱細胞血管の内腔に POG くり返し配列を介して REDV ペプチドを固定化した小口径脱細胞血管を開発した。REDV は脱細胞組織へ密度  $8.4 \times 10^{-6}$  molecules/nm<sup>3</sup> で固定化され、血中血管内皮前駆細胞 (EPCs) の捕捉や、ヘパリン化血の微小血栓付着を抑制する。一方で、in vitro での多血小板血漿 (PRP) による粘着試験では、REDV 固定化表面でも未修飾表面と同様に血小板粘着が示された。そこで、さらに高密度で REDV を固定化すれば、EPCs 捕捉能の向上と、血栓や血小板粘着を抑制できる新たな表面設計が可能ではないかと考えた。しかし、POG くり返し配列を介した固定化法では、コラーゲン鎖への結合領域が限定されるため、固定化密度を制御できない。そこで本研究では、ペプチド結合型シランカップリング剤 (Peptide conjugated silane-coupling agent; PCSi) による REDV 固定化法を考案した。脱細胞組織内部で PCSi の縮合反応が進行すれば、高密度固定が実現できる (Figure 1)。発表では、PCSi の合成ならびに REDV の固定化反応、血小板粘着試験と、hEPCs および HUVECs の接着試験について評価した結果を報告する。

**【実験方法】** ペプチド (G<sub>3</sub>REDV) と 3-(triethoxysilyl) propyl isocyanate を DMSO 中で 1 時間反応させ PCSi を得た。凍結乾燥したダチョウ頸動脈由来脱細胞血管へ 0.02–10% PCSi 溶液を滴下して、減圧乾燥により重合させた後、再水和によって PCSi 修飾グラフトを得た。放射性ヨウ素 (<sup>125</sup>I) 標識法により PCSi 修飾グラフトの REDV 固定化密度を定量した。一方、PCSi 修飾グラフト表面にミニプタ PRP を添加後、1 時間 37°C でインキュベートし、染色により粘着量を定量した。さらに、グラフト表面に対しヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を播種し、4 日間 37°C で培養した。その後アクチン染色を行い、接着量を定量した。また、ヒト血管内皮前駆細胞 (hEPCs) を播種し、24 時間 37°C で培養した。洗浄後、接着細胞数を定量した。

**【結果・考察】** FT-IR, EDS の表面解析から、PCSi 処理により、シラノール縮合を介して脱細胞組織表面に REDV が固定化されていることを確認した。また、PCSi により固定化された REDV 密度は、 $8.0 \times 10^{-3}$  molecules/nm<sup>3</sup> となり、POG くり返し配列を介した固定化法と比べて、REDV は 960 倍高密度で固定化された。PRP 添加後の表面を観察した結果、PCSi で修飾したグラフト表面には、血小板粘着はほとんど確認されなかった (Figure 2A)。活性のない REDV 配列をもつ PCSi により修飾した場合でも同様の結果を得たことから、ペプチド末端や側鎖の電荷が血小板粘着の抑制に寄与しているものと考察している。一方、HUVECs を播種した場合、PCSi 修飾により細胞の接着・伸展が認められた (Figure 2B)。さらに、固定化密度の増加に伴って hEPCs 接着数も増加したことから、PCSi は、脱細胞血管組織の表面に REDV を高密度で固定化し、血小板粘着の抑制と血管内皮細胞の接着を促進する新たな修飾剤として有用であることが示された。



**Figure 1** Synthesis of PCSi and modification of decellularized graft with PCSi.



**Figure 2** A) Platelet adhesion test on unmodified and PCSi-modified surface. (Scale bar = 200 μm) B) Actin staining of adherent cells on unmodified and PCSi-modified graft. (Scale bar = 100 μm)

### Peptide-conjugated silane-coupling agent for improving cell affinity and suppressing platelet adhesion of decellularized vascular graft surface

Kojima Kentaro<sup>1,2</sup>, Atsushi Mahara<sup>1</sup>, Yoshiaki Hirano<sup>2</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, <sup>2</sup>Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, Tel: +81-6-6833-5012 ext 2637, E-mail: [yamtet@ncvc.go.jp](mailto:yamtet@ncvc.go.jp)

## 生体吸収性材料に対する表面機能化コーティングとしてのシルクフィブロインの可能性

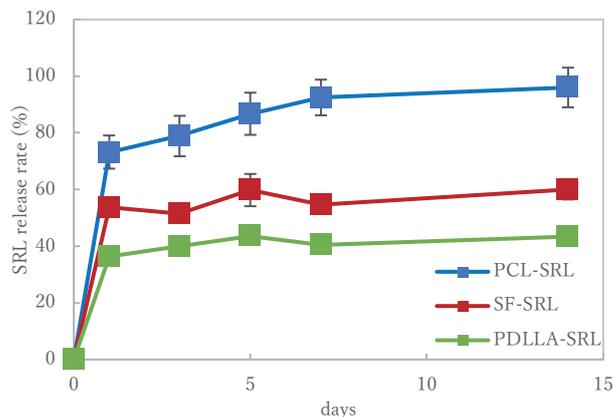
<sup>1</sup>熊本大学大学院先端科学研究部, <sup>2</sup>日本医療機器技研, <sup>3</sup>東京農工大学大学院工学研究科  
○徐 薇<sup>1</sup>, 佐々木 誠<sup>2</sup>, 朝倉 哲郎<sup>3</sup>, 新留 琢郎<sup>1</sup>

【緒言】 近年、心筋梗塞や狭心症等の虚血性心疾患を治療する方法として、冠動脈ステント留置術が主流となっている。しかし、CoCr合金を基材とする既存ステントは、患部に永久的に残存するため、血栓症等の有害事象発症リスクが指摘されている。これを背景に、生体吸収性材料が注目されており、Mg合金を基材とするステント（生体吸収性スキャフォールド）の開発が加速している。しかしながら、Mg合金は体内での分解（腐食）速度が極めて大きいことが課題であり、留置患部が治癒するまでの期間（約3ヵ月）血管を支持するためには表面処理が不可欠である。既存ステントの表面コーティング材料として用いられる生体分解性ポリエステルは、再狭窄抑制剤シロリムス（SRL）を溶出（徐放）する機能を有するが、分解過程において炎症を惹起する等の課題を抱えている。

本研究では、物性および生体適合性に優れたシルクフィブロイン（SF）に着目し、Mg合金腐食抑制効果ならびにSRL徐放効果を評価した。サンプルとして、SFが表面コーティングされたMg合金ステントを用いた。また、比較対象サンプルには、一般的にコーティング材料として用いられる生体分解性ポリエステルPCLならびにPDLLAを採用した。

【実験】 繭糸を精練（脱セリン）することによってSFを得た後、臭化リチウム溶液に溶解した。調製されたSF水溶液を凍結乾燥し、SFスポンジを得た。SFスポンジとSRLを混合し、ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解した。得られたSF-SRL溶液をディップコーティングによってステントにコーティングした。それに対して、PCLならびにPDLLAをそれぞれテトラヒドロフランに溶解した。得られた溶液をステントにスプレーコーティングし、比較対象サンプルを作製した。各サンプルをバルーンカテーテルに搭載した後、任意の環境下で所望サイズに拡張した。その後、37°C PBSにおけるSRL溶出挙動および血漿模擬溶液（E-MEM培地）におけるMg合金腐食挙動を分析した。また、各サンプル表面における生体適合性を評価した。

【結果と考察】 SRL溶出試験では、PCLにおいて、1日目にバースト放出が見られた。これは、PCLのガラス転移点が-50°Cであり、37°CにおいてSRLが放出されやすい結晶状態（ゴム状態）であったといえる。また、PDLLAの場合では、ゆるやかなSRL溶出挙動が確認された。これは、アモルファス構造を有するPDLLAの非晶領域にSRLが内包されたことが一因と考えられる。SFでは、バースト放出後に、SRL徐放挙動が確認された。このことから、SFが非晶領域と結晶領域を併せ持つことが示唆された。また、Mg合金腐食試験では、柔軟性と接着性を有するPCLならびにSFがステント拡張に伴う物理変化に追従し、局所的な腐食を抑制する効果が示唆された。さらに、各サンプル表面における生体適合性を評価した結果、SFコーティングの優れた細胞接着性を認めた。



### Compared silk fibroin with biodegradable polymer coating for Mg alloy scaffold application *in vitro*

Wei Xu<sup>1</sup>, Makoto Sasaki<sup>2</sup>, Tetsuo Asakura<sup>3</sup>, Takuro Niidome<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University

<sup>2</sup>Japan Medical Device Technology Co., Ltd, Kumamoto

<sup>3</sup>Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Engineering

Tel: +81-90-6296-0246, E-mail: [188d9404@st.kumamoto-u.ac.jp](mailto:188d9404@st.kumamoto-u.ac.jp)

## 二酸化炭素選択透過性と生体物質非応答性をもつ高分子複合素材の開発と人工肺への応用

茂木 龍一<sup>1</sup>, 西田 未来<sup>1</sup>, 中路 正<sup>1,2</sup>, 松村 和明<sup>3</sup>, 阪口 壽一<sup>4</sup>, 橋本 保<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 富山大学大学院理工学教育部, <sup>2</sup> 富山大学大学院生命融合科学教育部,

<sup>3</sup> 北陸先端科学技術大学院大学物質科学領域, <sup>4</sup> 福井大学大学院工学研究科

### 【緒言】

トリエチレングリコール鎖を有するトリエチレングリコールメチルビニルエーテル (TEGMVE) とビニロキシエトキシエチルメタクリレート (VEEM) の共重合体 (poly(TEGMVE-co-VEEM), Fig.1) は、二酸化炭素選択透過性を示すことがこれまでの研究で明らかにされている [1] ことから、この高分子素材は、生体医工学材料への応用が期待される。一方で、製膜性 (自立膜形成能) の悪さが大きな欠点として挙げられる。そこで、優れた柔軟性と製膜性を有し、アモルファス状態であれば比較的高い生体物質非応答性を示す 3-ヒドロキシブチレート-co-ヒドロキシヘキサノエート共重合体 (PHBH) と poly(TEGMVE-co-VEEM) の共重合体を複合化した高分子アロイとすることで、欠点を克服できるのではないかと着想するに至った。本研究では、前述の高分子アロイによる膜形成とその特性評価を行うとともに、大目標として、現在の人工膜型肺に代わる新たな素材の創出を掲げ、その可能性について検討した。

### 【実験】

種々組成比の poly(TEGMVE-co-VEEM) (TEGMVE:VEEM = 2:1, 6:1, 14:1) と PHBH を等量で混合し製膜した後、110 °C で一晚反応させ、VEEM 側鎖間での架橋を行った。作製したシートについて、濡れ性・力学強度・微細構造解析・生体物質応答に関する各種評価を行った。

### 【結果と考察】

シートの濡れ性は、TEGMVE 含率の上昇に伴って増加する傾向が認められた。これは、シート中の親水性の TEG 鎖の割合が増加すること起因すると考えられる。また、強度および柔軟性は、TEGMVE 含率の上昇に伴って低下する傾向が認められた。これは、VEEM 間の架橋点が増加するためと推察される。

さらに、タンパク質吸着および細胞接着を調査した結果、PHBH と poly(TEGMVE-co-VEEM) のポリマーアロイのシートは、PHBH 単独のフィルムと比べ、高い抑制効果が認められた。加えて、TEGMVE 含率の増加に伴い、タンパク質吸着量および細胞接着数が減少した。これは、生体物質非応答性を有する TEG 鎖が増加することによるものと考えられる。特に、TEGMVE:VEEM = 14:1 の poly(TEGMVE-co-VEEM) を用いた場合において、細胞の接着数が最も少なくなる結果となった (Fig.2)。

### 【参考文献】

[1] Sakaguchi, T., Ohashi, M., Shimada, K., Hashimoto, T., Synthesis and gas permeability of membranes of poly(vinyl ether)s bearing oxyethylene segments, *Polymer*, **2012**, *53*, 1659-1664.

### Development of polymeric alloy material with selective permeability of carbon dioxide and nonresponsiveness of biological matter and its application to artificial lung

Ryuichi Moteki<sup>1</sup>, Miku Nishida<sup>1</sup>, Tadashi Nakaji-Hirabayashi<sup>1,2</sup>, Toshikazu Sakaguchi<sup>3</sup>, Tamotsu Hashimoto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, <sup>2</sup> Graduate School of Biological Science and Education, <sup>3</sup> Graduate School of Engineering University of Fukui

Tel : 076-455-6552 Fax : 076-455-6552 E-mail : [m1771423@ems.u-toyama.ac.jp](mailto:m1771423@ems.u-toyama.ac.jp)

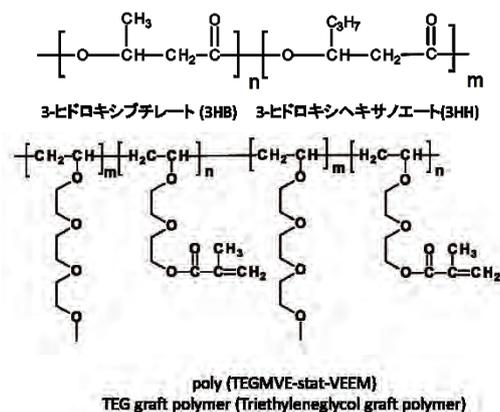


Fig.1 Structure of PHBH and TEGMVE-stat-VEEM.

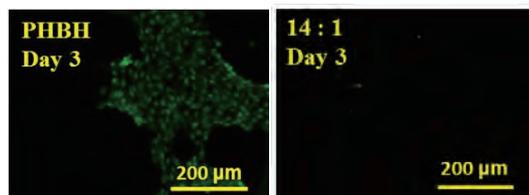


Fig. 2. Cell adhesion of PHBH film and mixed film of PHBH and TEGMVE-stat-VEEM.

## 血液透析代替システムの実現に向けた超吸水性ナノファイバーの開発

<sup>1</sup>東京理科大学大学院基礎工学研究科、<sup>2</sup>物質・材料研究機構 (NIMS) 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA)、<sup>3</sup>筑波大学大学院数理物質科学研究科  
○柘植 美礼<sup>1,2</sup>, 栗本 理央<sup>2,3</sup>, 菊池 明彦<sup>1</sup>, 荏原 充宏<sup>1,2,3</sup>

【緒言】慢性腎不全患者の多くは、血液透析を始めとする血液浄化法により延命・社会復帰しており、日本国内の透析患者数は32万人を超えている<sup>(1)</sup>。しかし、現行の透析治療は高度なインフラを要するため、大きな災害が起こると、現地の透析患者は治療のために集団疎開を余儀なくされる。このような背景のもと当研究室では、ライフラインが寸断された緊急時や通院できない非常時においても、一時的に急性尿毒症の応急処置が可能な新規治療システムの開発を行っている<sup>(2)(3)</sup>。本研究では、体内からの速やかな過剰水分の除去を目指し、高吸水性ポリマーであるpoly(sodium acrylate) (PSA)からなるナノファイバーメッシュの開発を行った。さらに本研究では、尿素やカリウムなどの吸着除去も考慮し、ゼオライトの内包も試みた。

【実験】まず、methanol中にpoly(acrylic acid) (PAA) (Mn=250,000)とethylene glycolを溶解した。調製した溶液に硫酸を加え、エレクトロスピンニング法によりナノファイバーを作製した。その後、130°Cで2時間静置した。続いて、ナノファイバーを水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムの混合溶液に1時間浸漬させ、PSA ナノファイバーを作製した。作製したPSA ナノファイバーの形状及び比表面積、吸水性能、尿素、カリウムの吸着性能を評価した。さらに、尿素的吸着能の向上を目指してPAA溶液に対し、10~50 wt%となるようにゼオライト(HSZ-840HOA、東ソー)を混合し、ナノファイバーメッシュを作製した。

【結果と考察】作製したPSA ナノファイバーメッシュに対して窒素吸着試験を行った結果、ナノファイバーは同質量からなるフィルムの393倍の比表面積を持つことがわかった。また、PSA ナノファイバーメッシュは自重の約8倍の吸水能を示し、フィルムの約2.5倍の吸水能を示した。これは、ナノファイバーの繊維状ナノ構造による毛細管現象に起因すると考えられる。さらに、水と同時に尿素、カリウムを吸着していることが分かった。さらに、エネルギー分散型X線分光法(SEM-EDX)、透過型電子顕微鏡(TEM)観察及び熱重量・示差熱分析(TG-DTA)からゼオライトを含有したナノファイバーの作製が確認できた。尿素及びカリウムの吸着試験を行った結果、尿素及びカリウムの吸着量は、ゼオライト量に依存して増加した。作製したファイバーを作製したファイバーを1日5回交換(1回につき30g)して使用することを想定すると1.5Lの水、1.3gの尿素、27mgのカリウムの除去が可能である。この結果から、ナノファイバーの形状をとることで、より効率的に吸水可能であること、ゼオライトを含有させることで尿素及びカリウムの吸着性能が向上することが示唆された。

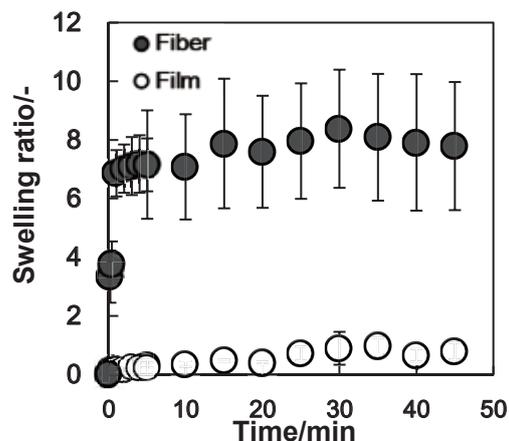


Figure 1 : Water absorption of PSA nanofiber mesh and the film in PBS.

Figure 1 shows the water absorption of PSA nanofiber mesh and the film in PBS. The swelling ratio of the fiber increases rapidly and reaches a plateau around 8.5 after 30 minutes, while the film shows very low swelling, remaining below 1 throughout the 50-minute period.

(1) 日本透析学会編：わが国の慢性透析療法の現況 <http://docs.jsdt.or.jp/overview/pdf2016/p003.pdf>

(2) K. Namekawa et al., Biomaterials Science., 2014, 2, 674-679. (3) R. Takai et al., J. Nanomater., 2016, 2016, 1-7.

### Development of water absorptive nanofiber meshes for hemodialysis treatments

Mirei Tsuge<sup>1,2</sup>, Rio Kurimoto<sup>2,3</sup>, Mitsuhiro Ebara<sup>1,2,3</sup>, Akihiko Kikuchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Science, <sup>2</sup>Interntl. Ctr for Mater. Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), <sup>3</sup>Grad. Sch. Pure & Appl. Sci., Univ. of Tsukuba

Tel: +81-29-851-3354, Fax: +81-29-851-3354, E-mail: EBARA.Mitsuhiro@nims.go.jp

## Sr イオン徐放能を付与した積層造形チタン合金の生体活性評価

<sup>1</sup>京都大学整形外科学講座, <sup>2</sup>中部大学生命健康科学部生命医科学科, <sup>3</sup>大阪冶金興業株式会社  
 ○清水 優<sup>1</sup>, 藤林 俊介<sup>1</sup>, 山口 誠二<sup>2</sup>, 森 重雄<sup>3</sup>, 北垣 壽<sup>3</sup>, 林 信実<sup>1</sup>, 正本 一誉<sup>1</sup>,  
 川田 交俊<sup>1</sup>, 森實 一晃<sup>1</sup>, 奥津 弥一郎<sup>1</sup>, 清水 孝彬<sup>1</sup>, 河井 利之<sup>1</sup>, 大槻 文吾<sup>1</sup>, 後藤 公  
 志<sup>1</sup>, 松田 秀一<sup>1</sup>

【緒言】高齡化社会により骨インプラントを必要とする手術は増加する一方, 骨粗鬆症のために骨インプラント周辺に早期緩みを生じることで再手術も増加する傾向にある。インプラント挿入時に起こる骨梁の microfracture を早期に治癒し, 骨インプラントの早期 osseointegration を促すにはデザイン, 表面形状および表面処理, インプラント材料を工夫する必要がある。積層造形法は任意の 3 次元 Computer Aided Design (CAD) モデルのデータを基に金属粉末にレーザーを照射し, 熔融層を積み上げながら造形することで任意の複雑な形状を作成可能な比較的新しい金属体作成法である。難加工材であるチタンにこの技術を応用することで, 多孔体形状を作成することが容易になり, 骨癒合の面では 500-600  $\mu\text{m}$  の気孔径が適していると当教室からも過去に報告している。また, 欧州では骨粗鬆症治療薬として認可されている Sr イオンには骨芽細胞ならびに破骨細胞に働いて骨形成能を高める作用があることは多く報告されてきている。そのためインプラントの表面に Sr イオンを付与することで, 早期の緩みなどを防止出来る可能性が示唆されている。今回, 我々は積層造形法にて作成したチタン合金 (Ti6Al4V) に従来のアルカリ加熱処理を発展させて処理層に Sr ならびに Ca イオンを含ませる処理を開発し, その vitro および vivo での生体活性評価を行った。

## 【実験】

積層造形法にて作成した Ti6Al4V (EOSINT M290 SLM machine (Electro Optical Systems GmbH, Germany) を使用) の solid な造形ままの試験板を水酸化ナトリウム処理後,  $\text{CaCl}_2$  と  $\text{SrCl}_2$  の混合溶液に浸漬し, これを加熱した後, 温水あるいは  $\text{SrCl}_2$  水溶液に浸漬した。こうして積層造形法で作成した未処理純チタン (SLM-pTi), 未処理チタン合金 (SLM-Ti6Al4V), Ca イオン徐放能付与チタン合金 (Ca-Ti6Al4V), Sr イオンおよび Ca イオン徐放能付与チタン合金 (Sr-Ti6Al4V) の 4 群で後述の実験を行なった。 vitro では材料の表面に MC3T3-E1 細胞を播種し, XTT アッセイ, PCR, ALP 活性, アクチン染色, SEM での評価を行った。また vivo は, 雄の日本白色家兔の両側脛骨に目的とする板状合金を埋入し, 2 週, 4 週での引き剥がし試験および組織学的評価を行った。

## 【結果と考察】

XTT アッセイ, ALP 活性とも各群で有意差を認めなかった。細胞を播種後 1 週間培養の段階での PCR では, Ca 及び Sr イオン溶出群で骨代謝の ALP, Runx2 は軽度上昇傾向であった。引き剥がし試験では 2 週, 4 週の段階で, 未処理群に比較してイオン溶出群で有意に引き剥がし強度の増加を認めた。Ti 金属は骨と結合しないため, 様々な処理法が開発されてきている。Sr を付与する手法も数多く報告があるが, 今回の溶液処理では特殊な装置を用いず複雑な形状の内部まで均一に処理が可能と考えられる。また, これまで Sr 処理を行なったチタン合金の 2 週の段階での力学的試験は報告が無く, 今回の実験では未処理に比較して早期に癒合することが示された。

**Bioactivity of strontium doped additive manufacturing Ti6Al4V: in vitro and in vivo studies**

Yu SHIMIZU<sup>1</sup>, Shunsuke FUJIBAYASHI<sup>1</sup>, Seiji YAMAGUCHI<sup>2</sup>, Shigeo MORI<sup>3</sup>, Hisashi KITAGAKI<sup>3</sup>, Makoto HAYASHI<sup>1</sup>, Kazutaka MASAMOTO<sup>1</sup>, Tomotoshi KAWATA<sup>1</sup>, Kazuaki MORIZANE<sup>1</sup>, Yaichiro OKUZU<sup>1</sup>, Takayoshi SHIMIZU<sup>1</sup>, Toshiyuki KAWAI<sup>1</sup>, Bungo OTSUKI<sup>1</sup>, Koji GOTO<sup>1</sup>, Shuichi MATSUDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin-Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan, <sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi, 487-8501, Japan, <sup>3</sup>Osaka Yakin Kogyo Co., Ltd., 4-4-28 Zuiko, Higashiyodogawa-ku Osaka, 533-0005, Japan

Tel: +81-75-751-3365, Fax: +81-751-8409, E-mail: [ys12687@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:ys12687@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

## 水熱環境下におけるチタン基板上への層状リン酸塩の生成

名古屋大学大学院工学研究科

○中村 仁, 金岡 宏明, 鳴瀧 彩絵, 大槻 主税

## 【緒言】

チタンやチタン合金の表面を、アルカリ水溶液と接触させて加熱処理することにより、チタン酸塩を形成して骨伝導性を付与する方法が知られている。すなわち、チタン系金属材料の表面に化学的な処理で、チタン化合物を形成させることで、生体に対する機能の付与が可能である。本研究では、チタン基板の表面に層状リン酸チタニウムを形成させる条件を探索した。層状リン酸チタニウムとして、 $\alpha$ 型リン酸チタニウム ( $\alpha$ -LTP:  $\text{Ti}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) がある。 $\alpha$ -LTP は、Ti 原子がリン酸基によって架橋されたヘテロ層  $[\text{Ti}_n(\text{PO}_4)_{2n}]^{2n-}$  を有しており、イオン交換により層間にカチオンを担持できる。層間に導入するカチオンを、生体必須元素とすれば、その徐放による組織再生の促進機能も付与できる。チタン基板をリン酸 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) と過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を含む水溶液で水熱処理し、 $\alpha$ -LTP の生成を調べた。

## 【実験】

テフロン製の水熱容器に  $\text{H}_3\text{PO}_4$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の水溶液 10 mL を入れ、チタン基板 ( $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ ) を浸漬し、 $120^\circ\text{C}$  で保持した。表 1 に、試料名と混合液の組成、反応時間をまとめた。なお、 $\text{H}_3\text{PO}_4$  を含有しない  $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液で処理したチタン基板を比較試料 (Control と表記) とした。得られた基板を超純水中で超音波洗浄した後、 $40^\circ\text{C}$  にて乾燥させた。試料の結晶相、表面および断面の形態について、X 線回折法 (XRD)、電解放射型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) およびエネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) にて調べた。

表 1. 試料名と処理条件

試料名	水溶液の組成 / $\text{mol}\cdot\text{L}^{-3}$		反応時間 / h
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_3\text{PO}_4$	
H2.5-24	2.5	4	24
H5.0-24	5.0	4	24
H8.5-24	8.5	4	24
H8.5-16	8.5	4	16
H8.5-08	8.5	4	8
Control	8.5	0	24

## 【結果と考察】

XRD パターンより、H2.5-24 および H5.0-24 ではチタンヒドライド ( $\text{TiH}_2$ ) のピークが検出された。一方、H8.5-24 では、 $2\theta=11.7^\circ, 20.9^\circ, 22.1^\circ$  および  $25.9^\circ$  に  $\alpha$ -LTP の 002,  $20\bar{2}$ ,  $11\bar{2}$  および  $20\bar{4}$  (ICDD:44-0382) に帰属されるピークが検出された。H8.5-16 および H8.5-08 の XRD パターンにも  $\alpha$ -LTP に帰属されるピークが検出された。ただし回折ピークの強度比  $I_{002}/I_{20\bar{4}}$  は、 $\text{H8.5-24} < \text{H8.5-16} < \text{H8.5-08}$  の順に増加する傾向が見られ、水熱処理の反応時間が短い試料ほど、(001) が配向して  $\alpha$ -LTP が形成することが示唆された。Control の XRD パターンからはアナターゼ型チタニア ( $\text{TiO}_2$ ) のピークが検出された。 $\alpha$ -LTP の生成は、チタン基板と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の反応による  $\text{TiO}_2$  の生成 ( $\text{Ti}+2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{TiO}_2+2\text{H}_2\text{O}$ ) および  $\text{TiO}_2$  と  $\text{H}_3\text{PO}_4$  の反応 ( $\text{TiO}_2+2\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ti}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}+\text{H}_2\text{O}$ ) により進むことが推察された。

FE-SEM 像より、H8.5-08 の表面からは幅  $10 \mu\text{m}$  以上の板状の析出物と、基板に垂直方向に生成した厚さ  $2 \mu\text{m}$  ほどの鱗片状の析出物が観察された。H8.5-16 と H8.5-24 の表面では、鱗片状の析出物のみが観察された。試料断面の EDX の結果から、全ての試料の表面においてリン (P) が検出された。したがってこれらの析出物は  $\alpha$ -LTP であり、H8.5-08 における板状の析出物の形態が、(001) が配向した  $\alpha$ -LTP 粒子であると示唆された。P のマッピング像より算出した基板表面の析出物の厚さは、H8.5-08, H8.5-16 および H8.5-24 でそれぞれ 25, 37 および  $46 \mu\text{m}$  であり、水熱処理の反応時間に伴い  $\alpha$ -LTP の生成量が増加することが明らかになった。

【謝辞】本研究は文部科学省卓越研究員制度の補助により行われたものである。

## Formation of Layered Titanium Phosphate on Titanium Substrate in Hydrothermal Environment

Jin Nakamura, Hiroaki Kanaoka, Ayae Sugawara-Narutaki, Chikara Ohtsuki

Graduate School of Engineering, Nagoya University

Tel: +81-52-789-3183, Fax: +81-52-789-3182, E-mail: nakamura@chembio.nagoya-u.ac.jp

## イノシトールリン酸と銀イオンを利用した綿形状人工骨への抗菌性付与

<sup>1</sup> 明治大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup> 明治大学研究・知財戦略機構, <sup>3</sup> ORTHOREBIRTH 株式会社, <sup>4</sup> 名古屋工業大学大学院生命・応用化学専攻

○相澤 守<sup>1</sup>, 本田 みちよ<sup>1</sup>, 阿部 航大<sup>1</sup>, 横田 倫啓<sup>2</sup>, 大坂 直也<sup>3</sup>, 牧田 昌士<sup>3</sup>, 西川 靖俊<sup>3</sup>, 春日 敏宏<sup>4</sup>

### 【緒言】

チタンなどの金属材料にフレーム溶射法などによって抗菌性を付与する技術はよく知られているが、複雑な形状をもつインプラントに抗菌性を付与する技術ははまだ確立されていない。そこで、我々は、キレート能を有するイノシトールリン酸(IP6)に着目し、IP6を介してカルシウム化合物と抗菌性をもつ銀イオンとを固定化させる抗菌性付与技術を確立した[1]。本研究では、複雑な形状をもつ「綿形状人工骨(ReBOSSIS)」に本法を適用し、綿形状人工骨に抗菌性を付与するプロセスの確立を試みた。より具体的には、銀イオン濃度の異なる抗菌性綿状人工骨を試作し、その材料特性と抗菌性を評価したので報告する。

### 【実験】

まず、所定量を秤り取った ReBOSSIS を 6 well プレートに移し、そこに 1000 ppm の IP6 水溶液 (pH 7; 5 cm<sup>3</sup>) を加え、37°C で 24 h インキュベートした。その後、同容量の純水で 5 回洗浄したのち、所定の濃度の硝酸銀水溶液 (0, 5, 10, 20 mM; 5 cm<sup>3</sup>) に浸漬し、同容量の純水で 5 回洗浄して風乾させて「銀担持 ReBOSSIS」を作製した。得られた銀担持 ReBOSSIS の微細構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察するとともに、エネルギー分散型 X 線分光法(EDX)により銀イオンの存在を確認した。また、総銀担持量を高周波誘導結合プラズマ発光分光法(ICP-AES)により決定し、さらに銀担持 ReBOSSIS からの銀イオンのリリースについて調べた。これらの材料科学的評価に加え、綿形状人工骨をペレット状に加工して阻止円法により抗菌性についても評価した。

### 【結果と考察】

まず、作製した銀担持 ReBOSSIS の微細構造を SEM により観察したところ、IP6 による銀イオン固定化後も ReBOSSIS の表面構造にはほとんど変化がないことが分かった。また、その視野における元素の分布を EDX により分析したところ、繊維形状に対応する分布で、カルシウム、リン、銀が分布していることが明らかとなった。カルシウムは ReBOSSIS に無機フィラーとして添加しているβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)および炭酸カルシウムに起因するものである。リンは前述したβ-TCP および IP6 に起因する。また、固定化させた銀も比較的均質に分布しており、IP6 を利用した銀イオン固定化法は綿形状のような極めて複雑な材料形態にも適用可能であることが分かった。また、今回調べた範囲では、硝酸銀水溶液濃度の選択により、ReBOSSIS 1 g あたり銀担持量を 0 から 50 mg まで制御することが可能であり、その銀担持量に依存して溶出量も増大していた。一方、抗菌性に関しては、銀イオンを固定化していないペレットとともに大腸菌を培養した場合、ペレット周囲には菌が増殖し、阻止円の形成が認められなかった。これに対し、銀イオンを固定化したペレットでは、いずれも試料片周辺で大腸菌が増殖せず、阻止帯の形成が認められた。これらの結果は、IP6 による銀イオンの固定化が複雑形状をもつ綿形状人工骨(ReBOSSIS)に関しても有効であることを示している。銀担持 ReBOSSIS の細胞毒性については当日報告する。

[1] H. Kakinuma et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103A**, 57-64(2014). DOI: 10.1002/jbm.a.35157

### Addition of anti-bacterial property to cotton-shaped artificial bone filler using inositol phosphate and silver ions

Mamoru Aizawa<sup>1</sup>, Michiyo Honda<sup>1</sup>, Kodai Abe<sup>1</sup>, Tomohiro Yokota<sup>2</sup>, Naoya Osaka<sup>3</sup>, Masashi Makita<sup>3</sup>, Yasutoshi Nishikawa<sup>3</sup>, and Toshihiro Kasuga<sup>4</sup>

<sup>1</sup>School of Science and Technology, Meiji University, <sup>2</sup>Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University, <sup>3</sup>ORTHOREBIRTH Co. Ltd., <sup>4</sup>Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Tel: +81-44-934-7237, E-mail: mamorua@meiji.ac.jp

## MC3T3-E1 培養下における SUS316L ステンレス鋼上での酸素還元過程

<sup>1</sup>大阪大学大学院 工学研究科  
○宮部 さやか<sup>1</sup>, 計田 大希<sup>1</sup>, 藤本 慎司<sup>1</sup>

【緒言】医療用金属材料として使用されるステンレス鋼の耐食性は、表面に形成される厚さ数 nm の緻密な酸化皮膜である不働態皮膜に由来する。耐食性の理解にはアノード・カソード両反応を明らかにする必要があるが、これまでの研究の多くは損傷部のアノード反応に着目した研究である。電流制御分極法は、電流印加によって急速なカソード反応を生じさせた際の電位の過渡応答に基づき、健全な不働態皮膜におけるカソード反応過程を電気化学的に検討する手法である。我々の研究グループでは、電流制御分極法を用いて水溶液中でのステンレス鋼のカソード反応についての検討を行ってきた。ステンレス鋼が生体材料として使用される生体環境には、塩化物イオンなどの無機イオンに加えアミノ酸、タンパク質、細胞などの生体環境特有の物質が存在している。本研究では生体環境に含まれるタンパク質や細胞がステンレス鋼のカソード反応に及ぼす影響を明らかにするため、細胞培養をともなう模擬生体環境にて SUS316L ステンレス鋼への電流制御分極を行った。

【実験】供試材は SUS316L ステンレス鋼とし、 $\phi 25$  mm の円盤状に切り出した。SiC 研磨紙#2000 まで湿式研磨した後、アセトン、エタノール、脱イオン水で超音波洗浄し、オートクレーブにて滅菌処理を行った。37°C、5%CO<sub>2</sub> に保持したインキュベーター内に設置した電気化学セル（白金を対極、Ag/AgCl を参照電極とした 3 電極セル）にて、試料を次の 3 種類の条件で保持した。(1)  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium) 溶液（タンパク質非含有）に浸漬、(2)  $\alpha$ -MEM+10 vol%FBS (Fetal Bovine Serum; ウシ胎児血清) 溶液（タンパク質含有）に浸漬、(3) 試料表面上に骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を播種し  $\alpha$ -MEM+10 vol%FBS 溶液にて培養。各条件の試料を以後、(1) を  $\alpha$ -MEM、(2) を  $\alpha$ -MEM+FBS、(3) を  $\alpha$ -MEM+FBS+cells と表記する。浸漬開始から 3, 4, 5, 6, 7 日目に、パルス状電流 ( $-100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  を 0.1 s 間印加) を試料に印加する電流制御分極試験を行い、電位の経時変化を測定した。また、皮膜容量を求めるために電流制御分極試験とは別に電気化学インピーダンス測定を行った。

【結果と考察】電流制御分極試験中の電位は全ての試料において、電流印加開始直後に降下し、印加中は降下し続け、印加終了とともに回復に転じた。電位の降下および回復挙動は試料によって異なる挙動を示し、電位が降下した際の最小値からおおよそ電流印加直前の自然電位（電位最小値 + (電流印加直前の自然電位 - 電位の最小値)  $\times$  99%）まで回復（99%電位回復）するのに要した時間は  $\alpha$ -MEM、 $\alpha$ -MEM+FBS、 $\alpha$ -MEM+FBS+cells の順に長くなった。さらに、 $\alpha$ -MEM+FBS および  $\alpha$ -MEM+FBS+cells では浸漬日数の経過とともに 99%電位回復に要した時間は増加した。電気化学インピーダンス測定より求めた皮膜容量を用いて算出した酸素還元電流密度は  $\alpha$ -MEM+FBS+cells、 $\alpha$ -MEM+FBS、 $\alpha$ -MEM の順に大きくなった。酸素還元電流密度は浸漬日数の経過とともに減少し、この傾向は特に  $\alpha$ -MEM+FBS および  $\alpha$ -MEM+FBS+cells にて顕著であった。以上のことから、試料表面へのタンパク質堆積や細胞接着は酸素還元反応を抑制することが示唆された。

---

**Oxygen reduction process on Type 316L stainless steel with MC3T3-E1 culture**

Sayaka Miyabe<sup>1</sup>, Taiki Hakata<sup>1</sup>, Shinji Fujimoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering Osaka University

Tel: +81-6-6879-7470, Fax: +81-6-6879-7471, E-mail: miyabe@mat.eng.osaka-u.ac.jp

## 椎間板組織再生のための細胞低接着性コラーゲンの開発

<sup>1</sup>近畿大学生物理工学部, <sup>2</sup>神戸大学大学院医学研究科, <sup>3</sup>神戸医療産業都市推進機構医療イノベーション推進センター

○森本康一<sup>1</sup>, 國井沙織<sup>1</sup>, 武岡由樹<sup>2</sup>, 由留部 崇<sup>2</sup>, 加藤暢宏<sup>1</sup>, 尾前 薫<sup>3</sup>, 黒田良祐<sup>2</sup>

【緒言】椎間板は中心に位置する髄核, その周囲を囲む線維輪, さらに脊椎椎体を隔てる軟骨終板からなる特殊な構造をとり, 椎間板髄核は人体最大の無血管組織である. 椎間板髄核に局在する細胞は栄養供給の大部分を椎体からの拡散に依存しており, 低栄養・低酸素・強酸性を特徴とした過酷環境に曝されている. そのため軟骨終板の硬化や石灰化などにより, 容易に細胞死や細胞外基質の分解などの退行性変化が生じる. このような椎間板の変性の治療法として, 今日, 幹細胞の移植や成長因子の投与などが試みられている. しかし, 幹細胞の定着率は極めて低く, 成長因子投与は異所性骨化の恐れがある. またヒアルロン酸ゲルやアテロコラーゲンゲルなどの既存の細胞足場は椎間板再生に効果がなく, 未だ解決すべき問題が多い. 一方, 我々はスフェロイドを形成し, 骨分化誘導を促進する細胞低接着性コラーゲン (LASC<sub>Col</sub>, Low Adhesive Scaffold Collagen) を開発し (2017 年度本大会で発表), LASC<sub>Col</sub> にはアテロコラーゲンと異なる特徴があることを明らかにしてきた. そこで本研究では, LASC<sub>Col</sub> のゲル化特性をレオロジー特性評価装置により測定し, ヒト椎間板の髄核・線維輪由来細胞の形態変化と組織特異的な発現タンパク質量を調べ, さらにラット椎間板髄核摘出モデルを用いて LASC<sub>Col</sub> ゲルの *in vivo* での椎間板再生能を検討したので報告する.

【方法と材料】LASC<sub>Col</sub> ゲルの作製と特性: ブタ皮膚由来アテロコラーゲンから LASC<sub>Col</sub> を調製した. LASC<sub>Col</sub> 溶液を 37°C に保温することでゲル化させ, すぐさまレオメーター (HAAKE MARS III) で貯蔵弾性率 ( $G'$ ) の経時変化を測定した. 測定開始 30 分後の  $G'$  の LASC<sub>Col</sub> 濃度依存をまとめた. 細胞実験: マウス NIH/3T3 細胞を LASC<sub>Col</sub> ゲル上に播種してスフェロイド形成能を位相差顕微鏡で確認した. ヒト椎間板髄核・線維輪手術の 15 検体より細胞を回収して LASC<sub>Col</sub> ゲル貼付プレートとアテロコラーゲン (AC) ゲル塗布プレート上で培養し, スフェロイド数を経時的に計測した. また多重蛍光免疫染色で Brachyury, Tie2, PAX1, Aggrecan などの発現強度を観察した. 動物実験: 12 週齢雄 SD ラット 16 匹の第 8/9, 9/10, 10/11 尾椎椎間板直上に切開を加え, 髄核を全摘出した. 各椎間へ LASC<sub>Col</sub> ゲル, AC ゲル, 溶媒 (対照群) を注入し, 術後 56 日までの組織標本を作成し, HE 染色で細胞浸潤を, Safranin-0 染色で椎間板内の細胞外基質占拠率を調べた.

【結果と考察】LASC<sub>Col</sub> ゲルの作製と特性: 14 mg/mL までのブタ皮膚由来 LASC<sub>Col</sub> ゲルを調製して貯蔵弾性率を測定した結果,  $G'$  ( $t=30$  min) は LASC<sub>Col</sub> 濃度に依存して増加した. 細胞実験: NIH/3T3 細胞は LASC<sub>Col</sub> ゲル上に播種後速やかにスフェロイドを形成した. 髄核・線維輪細胞ともに LASC<sub>Col</sub> ゲル上でスフェロイドを形成したが, AC ゲル上でスフェロイド形成はみられなかった ( $p<0.01$ ). 髄核細胞は LASC<sub>Col</sub> ゲル上で AC ゲル上に比べ Brachyury, Tie2, Aggrecan の発現量亢進を認めた ( $p<0.01$ ). 線維輪細胞は両群で PAX1 と Aggrecan の発現を認めたが, Aggrecan は LASC<sub>Col</sub> ゲル上でより多く発現していた ( $p<0.01$ ). 動物実験: HE 染色では, LASC<sub>Col</sub> ゲル群と AC ゲル群とともに髄核様組織が存在したが, LASC<sub>Col</sub> ゲル群でのみ細胞浸潤が観察された ( $p<0.01$ ). Safranin-0 染色で LASC<sub>Col</sub> ゲル群では AC ゲル群に比べ髄核様組織でのプロテオグリカンの誘導と蓄積が著しかった ( $p<0.01$ ).

【謝辞】本研究内容は, JSPS 科研費 若手研究 18K16659 (T.Y.) と JST A-STEP シーズ育成タイプ (K.M.) の研究助成で得られた成果です. コラーゲン材料をご提供いただきました新田ゼラチン株式会社に感謝いたします.

---

### Development of Low Adhesive Scaffold Collagen gel for regeneration of intervertebral disc tissues

Koichi Morimoto<sup>1</sup>, Saori Kunii<sup>1</sup>, Yoshiki Takeoka<sup>2</sup>, Takashi Yurube<sup>2</sup>, Nobuhiro Kato<sup>1</sup>, Kaoru Omac<sup>3</sup>, Ryosuke Kuroda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, Kindai University, <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine, <sup>3</sup>Translational Research Center for Medical Innovation

Tel: +81-736-77-3888, Fax: +81-736-77-4754, E-mail: morimoto@waka.kindai.ac.jp

## ヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチド cellnest による β-TCP の骨形成能向上

<sup>1</sup>富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&テクノロジー開発センター, <sup>2</sup>富士フイルム株式会社 医薬品・ヘルスケア研究所

○武田 香織<sup>1</sup>, 岡村 愛<sup>1</sup>, 江角 将之<sup>1</sup>, 伏見 英生<sup>1</sup>, 平塚 崇浩<sup>1</sup>, 我妻 昭彦<sup>1</sup>, 石井 善雄<sup>2</sup>, 畠 賢一郎<sup>1</sup>

【緒言】骨欠損の治療において、リン酸カルシウム系骨補填剤が臨床現場に普及している。しかしながら、一般に用いられているβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)やハイドロキシアパタイト(HA)を材料とした骨補填剤は近接の骨に依存した骨形成能(骨伝導能)しか有しておらず、既存骨と独立した骨形成能(骨誘導能)を併せ持つ新規骨補填剤の開発が望まれている。我々は、当社開発の新規足場素材であるヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチド(cellnest)の骨補填剤への応用を検討してきた。cellnestは、ヒトI型コラーゲンのα1鎖から抗原性部位を除き、インテグリンとの接着性が高いRGD配列が連なるよう改変した新規素材であり、骨形成において不可欠である細胞の良好な接着を促すと期待される<sup>1</sup>。加えて、動物由来成分を含まないため将来的なヒトへの応用においても、高い安全性を確保できる。今回、β-TCPとcellnestを組み合わせた製剤を作製し、cellnestがもたらす骨補填剤としての機能向上について検討した。

【結果と考察】β-TCP顆粒を37℃にて7.5wt% cellnest溶液に3時間浸漬させ、50℃にて一晚乾燥させた後に熱架橋処理を施すことで、cellnestをコートしたβ-TCP製剤(cellnest(+))を得た。製剤の凍結切片を作成し、cellnestをエオジン染色して観察したところ、cellnestが製剤内部まで浸透してβ-TCPをコートしたことが確認された。β-TCPに対するcellnestコート量は、熱重量示唆熱分析(TG-DTA)により8.5wt%と測定された。

続いて、cellnestコートを施していないβ-TCP顆粒(cellnest(-))を対照として、*in vitro*にて製剤への細胞接着性を試験した。製剤を24well超低接着プレートに入れ(10±0.2mg/well)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBMSC, Lonza)を播種した(5×10<sup>4</sup> cells/well)。播種後24時間時点の製剤への接着生細胞数についてATP量を指標として定量したところ、cellnest(+)ではcellnest(-)の約1.5倍の細胞接着数が確認された。接着した生細胞をカルセイン染色し、形態を蛍光顕微鏡で観察したところ、cellnest(-)では球状が多いのに対しcellnest(+)では良好に伸展していることが確認された。cellnestはβ-TCP上で細胞の良好な足場として寄与するものと考えられ、β-TCP顆粒を骨補填剤として用いる場合において、製剤上での骨形成に寄与する可能性があると考えられる。

そこで、ラット頭頂骨欠損モデルにおいてcellnest(-)およびcellnest(+)の骨形成能を評価した。SDラット(オス、10週齢)の頭頂骨に直径5mmの円形骨欠損を作成し、製剤(8.0±0.2mg)を埋植した後、骨膜および皮膚を縫合した。1週間毎にマイクロCT計測を行い、Bone Mineral Density(mg/cm<sup>3</sup>)を指標として骨形成量を評価したところ、埋植後2週以降cellnest(+)の方が有意に高いことが確認された。埋植後8週時点の組織学的評価(ヘマトキシリン・エオジン染色)からは、骨量のみならず骨のでき方の違いも明らかとなった。cellnest(-)では製剤と新生骨の間に線維性組織が存在しているのに対し、cellnest(+)では新生骨と製剤が良好に癒合していることが確認された(Figure 1)。さらに、cellnest(+)においては既存骨と独立した骨誘導様の骨形成が観察された。これらは、cellnestがβ-TCP上で細胞の良好な足場として寄与した結果と考えられる。

【まとめ】cellnestコートはβ-TCPに対する細胞接着を促進し、骨補填剤として用いる場合、骨伝導に加え骨誘導様の作用による高い骨形成能を付与すると考えられる。cellnestが、骨再生を目的とした無機材料のコート材として有用である可能性が示唆された。

1. 吉岡 康弘, 前川 敏彦, 我妻 昭彦, BIO Clinica, 2016年31巻10号(通巻413号)9月号 p.61-65

### Enhanced bone regeneration with β-TCP based bone graft by cellnest™ recombinant peptide derived from human collagen type I

Kaori Takeda<sup>1</sup>, Ai Okamura<sup>1</sup>, Masayuki Ezumi<sup>1</sup>, Hideo Fushimi<sup>1</sup>, Takahiro Hiratsuka<sup>1</sup>, Akihiko Azuma<sup>1</sup>, Yoshio Ishii<sup>2</sup>, Kenichiro Hata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioscience & Technology Development Center, Fujifilm Corporation, <sup>2</sup>Pharmaceutical & Healthcare Research Laboratories, Fujifilm Corporation

Tel: +81-465-86-3023, Fax: +81-465-86-1019, E-mail: kaori.takeda@fujifilm.com

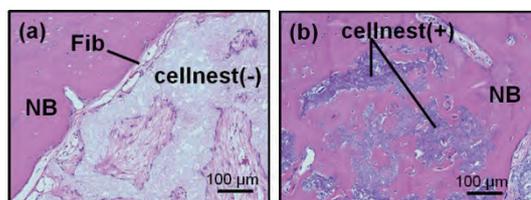


Figure 1. Representative images of hematoxylin and eosin (H&E) stained histological sections at the bone defect region. (a) cellnest (-), (b) cellnest (+). Note that the cellnest (+) is colored by H&E due to the cellnest while the cellnest (-) is uncolored. Fib: fibrous tissue. NB: new bone.

## 骨粗鬆症モデルラットによるリン酸オクタカルシウムの骨組織応答性に関する研究

<sup>1</sup>東北大学大学院医学研究科整形外科, <sup>2</sup>東北大学大学院歯学研究科<sup>2</sup>顎口腔機能創建学分野, <sup>3</sup>歯学イノベーションリエンゾンセンター, <sup>4</sup>九州大学先端物質科学研究所 ソフトマテリアル学際化学分野  
○馬場一慈<sup>1,2</sup>, 塩飽由香利<sup>2,3</sup>, 穴田貴久<sup>2,4</sup>, 濱井瞭<sup>2</sup>, 森優<sup>1</sup>, 井樋栄二<sup>1</sup>, 鈴木治<sup>2</sup>

【緒言】リン酸オクタカルシウム (OCP) は生理的環境下でハイドロキシアパタイト (HA) に徐々に加水分解し骨芽細胞の分化を促進することから骨形成能を持つ人工材料として期待される[1] [2]。また, OCP は破骨細胞様細胞による吸収を受け, *in vitro* で破骨細胞形成を促進する性質を有する生体内吸収材料である[3]。骨粗鬆症は, 破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回ることによって骨量が減少する病態である[4]。そこで細胞活性化能を有する OCP が骨粗鬆症下においても骨形成を示すかどうかを検討した。本研究では骨粗鬆症モデルラットを用い, 天然高分子である gelatin (Gel) と OCP の複合体 (OCP/Gel 複合体) を作製し [5], OCP/Gel 複合体の骨組織反応について X 線学的, 組織学的に検討することを目的とした。

【実験】OCP 含有率が高用量の OCP/Gel 複合体 (高用量群) と, OCP 含有率が低用量の OCP/Gel 複合体 (低用量群) の 2 種類の OCP/Gel 複合体を作製した。12 週齢 Sprague-Dawley (SD) 雌ラットに卵巣摘出手術 (OVX) を行い, その後 12 週間飼育した。その後左脛骨内側に直径 3 mm, 深さ 3 mm の骨孔を作製し, OCP/Gel 複合体を埋入した。埋入後 4, 8 週で安楽死させ両側脛骨を回収した。非埋入側の脛骨近位の骨密度測定を行い, 偽手術ラット (Sham) の脛骨近位を対照とした。回収した埋入側脛骨は  $\mu$ CT 画像で X 線学的評価を行った。X 線学的評価後, 脱灰標本を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色, オステオカルシン免疫染色を行い, 埋入部位について組織学的評価を行った。HE 染色を用いて骨欠損部における新生骨面積を皮質骨領域, 髓腔内領域にわけて計測した。TRAP 染色, オステオカルシン免疫染色では陽性細胞数を皮質骨領域, 髓腔内領域に分けて計測した。統計学的評価は t 検定を行い,  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

【結果と考察】脛骨近位は, 埋入後 4 週 8 週とも髓腔内では有意に骨密度が減少していたが, 皮質骨は有意差が見られなかった。 $\mu$ CT 画像では OCP/Gel 複合体埋入部周囲の放射線透過性は低下していた。HE 染色では OCP/Gel 複合体において, 材料埋入部では材料周囲を取り囲むように骨新生が見られた。新生骨面積は高用量群, 低用量群とも埋入後 4 週から 8 週にかけて皮質骨領域, 髓腔内領域ともに増加していた。埋入後 4, 8 週とも皮質骨領域では低用量群が, 髓腔内領域では高用量群で新生骨面積が多く, 埋入後 8 週の皮質骨領域では低用量群において有意に新生骨がみられた。TRAP 陽性細胞数は, 低用量群では埋入後 4 週から 8 週にかけて皮質骨領域, 髓腔内領域ともに減少していたが, 高用量群では皮質骨領域で増加し, 髓腔内領域においては細胞数に変化はなかった。オステオカルシン陽性細胞数は, 低用量群では皮質骨領域で埋入後 4 週から 8 週にかけて増加傾向であったが, 髓腔内領域では減少傾向であった。一方, 高用量群では埋入後 4 週から 8 週にかけて皮質骨領域, 髓腔内領域ともに増加傾向であった。OCP 含有率が高いことで TRAP 陽性細胞およびオステオカルシン陽性細胞の出現が誘導され, 埋入後 8 週経過してもこれらの細胞が増加して新生骨の形成が増加していると考えられた。

骨粗鬆症モデルラットにおいても, OCP 存在下では TRAP 陽性細胞を刺激しオステオカルシン陽性細胞を誘導することで骨新生を促すことが示唆された。

### 【参考文献】

- 1) O. Suzuki et al. *Biomaterials* 27(13) (2006) 2671-2681.
- 2) T. Anada et al. *Tissue engineering. Part A* 14(6) (2008) 965-978.
- 3) M. Takami et al. *Tissue engineering. Part A* 15(12) (2009) 3991-4000.
- 4) M. Li et al. *Bone* 20(1) (1997) 55-61.
- 5) K. Saito et al. *RSC Advances* 6(2016) 64165-64174.

### The bone formation of octacalcium phosphate in ovariectomized rat

Kazuyoshi Baba<sup>1,2</sup>, Yukari Shiwaku<sup>2,3</sup>, Takahisa Anada<sup>2,4</sup>, Ryo Hamai<sup>2</sup>, Yu Mori<sup>1</sup>, Eiji Itoi<sup>1</sup>, Osamu Suzuki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Tohoku University School of Medicine, <sup>2</sup>Division of Craniofacial Function Engineering, Tohoku University Graduate School of Dentistry, <sup>3</sup>Liaison Center of Innovative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan, <sup>4</sup>Institute for Materials Chemistry and Engineering, Fukuoka, Japan  
Tel: +81-22-717-7635, E-mail: kazuyoshi714@gmail.com ; suzuki-o@m.tohoku.ac.jp

## 生体活性ガラス/ポリ乳酸複合化異方性ファイバーマットを用いた骨芽細胞の配列制御

<sup>1</sup>大阪大学, <sup>2</sup>名古屋工業大学

○李 誠鎬<sup>1</sup>, 松垣 あいら<sup>1</sup>, 春日 敏宏<sup>2</sup>, 中野 貴由<sup>1</sup>

### 【緒言】

骨組織はアパタイトの結晶方位・コラーゲン線維の配向からなる、異方性構造を示す。当研究グループでは、骨の力学特性は骨量より骨組織の配向(骨質)に支配的に影響されることを初めて報告し、骨芽細胞を配向させることで骨配向構造の形成が可能であることを明らかにした。そこで、生体材料上の骨芽細胞の配列方向を制御することにより、配向化した骨組織の再生及び、力学特性の早期回復が期待される。Bioglass<sup>®</sup>は、溶出したケイ酸・Ca<sup>2+</sup>イオンにより、骨芽細胞の増殖・分化を促進すると報告されている。また、Mg<sup>2+</sup>イオンは細胞接着性の向上、Sr<sup>2+</sup>イオンは骨芽細胞の増殖・分化を促進する効果があると報告されている。本研究では、Bioglass<sup>®</sup>のCaOをMgO, SrOに置換したガラスを用意し、生分解性のポリマーであるポリ乳酸(PLLA)と複合化させた。複合体は、細胞配列を制御するため、エレクトロスピンニング法を用いて異方性スキャフォールドを作製した。得られたファイバーマットの形状、イオン溶出挙動、細胞増殖性、細胞配向度を評価した。

### 【実験】

46.1SiO<sub>2</sub>·26.9MO·24.4Na<sub>2</sub>O·2.6P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (mol%, M = Mg, Ca, Sr)組成のガラスを熔融法(1500 °C, 30 min)にて作製後、自動乳鉢にて粉碎した。PLLAに対するBG<sub>M</sub>の含有量がx = 10, 30 vol%の複合体を加熱混練法(190 °C, 20 min)にて作製した。複合体中のPLLAが14 wt%となるようクロロホルムに溶解させた紡糸溶液を用い、エレクトロスピンニング法にて異方性ファイバーマット(略称: BG<sub>Mx</sub>, M = Mg, Ca, Sr, x = 10, 30)を作製した。作製したファイバーマットの繊維径・配向度、イオン溶出挙動を評価した。異方性ファイバーマット上での、骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)による細胞増殖性、新生マウスの頭蓋冠より初代骨芽細胞を抽出し培養3日後の細胞配向度を評価した。

### 【結果と考察】

異方性ファイバーマットの繊維配向度は、BG<sub>M10</sub>がBG<sub>M30</sub>より大きい値を示した。BG<sub>M10</sub>は分子量が大きく多分散度が低いため、エレクトロスピンニングを行う際、安定なジェットが形成され、回転コレクター上のファイバー配列を一方方向に制御でき、高い繊維配向度が得られたと考えられる。一方、30 vol%含有複合体は、低い分子量・大きい多分散度を示し、ジェットが分岐され繊維配向度の低下が見られたと考えられる。骨形成を促進するMg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, ケイ酸イオンの溶出量は時間と共に増加しており、イオンの徐放が期待できる。BG<sub>Mg<sub>x</sub></sub>とBG<sub>Sr<sub>x</sub></sub>の細胞数はControlのPLLAファイバーマットに比べ多く、溶出したMg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, ケイ酸イオンにより、骨芽細胞の接着や増殖が促進されたと考えられる。BG<sub>M10</sub>の細胞配向度は、BG<sub>M30</sub>より大きい値を示した。その原因は、BG<sub>M10</sub>の繊維径がBG<sub>M30</sub>より大きく、細胞が単一繊維表面に接着することで、ファイバーマットの異方性形状により細胞配列が制御されたためと考えられる。今回作製した異方性ファイバーマットのBG<sub>Mg10</sub>, BG<sub>Sr10</sub>はControlに比べ多い細胞数を示し、高い細胞配向度を示すことから、骨量・骨質の両方を同時に回復し、異方性骨組織を早期に再建できる材料として期待できる。

---

### Control of osteoblast arrangement by bioactive glass / poly(lactic acid) composite fibermats

Sungho Lee<sup>1</sup>, Aira Matsugaki<sup>1</sup>, Toshihiro Kasuga<sup>2</sup>, Takayoshi Nakano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University

<sup>2</sup>Division of Advanced Ceramics, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Tel: +81-6-6879-7507, Fax: +81-6-6879-7507, E-mail: leesungho@mat.eng.osaka-u.ac.jp

## アパタイト核を用いた疎水化セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与

京都大学大学院 エネルギー科学研究科  
○吉岡 拓哉、薮塚 武史、高井 茂臣

### 【緒言】

セルロースナノファイバー (CNF) は、軽量、高強度、低熱膨張性を併せ持つ植物由来材料であり、近年様々な産業分野で注目を集めている。この CNF にアパタイト形成能を付与することができれば、適度な強度と弾性率、骨伝導性の 3 点を併せ持つ新規骨修復材料への展開が期待できる。過去の研究では、擬似体液 (SBF) の過飽和度を調整することで得られるアモルファスリン酸カルシウム微粒子、アパタイト核 (AN)<sup>1)</sup> との複合により CNF にアパタイト形成能を付与させることに成功し、さらに AN を 10 wt% 以上複合した場合に、高いアパタイト形成能が発現されることを見出した。しかし多くの場合、CNF は疎水化することにより化学的安定性および機械的強度を得る。そこで本研究では、アルキルケテンダイマー (AKD) 処理による CNF の疎水化を試み、AN を疎水化 CNF に複合させたときのアパタイト形成能を、SBF を用いた試験により評価した。

### 【実験】

SBF の 2 倍の濃度を有する水溶液を調製した。これにトリス緩衝剤を溶解して 36.5 °C、pH 8.2 に調整し、36.5 °C の恒温槽で 1 日間保持することで、AN を析出させた。析出させた AN を吸引濾過により回収した。得られた AN を 0 wt.%, 1 wt.%, 5 wt.%, 10 wt.% の重量割合でスラリー状の CNF に混合し、プレス成型を行い、50 °C の恒温槽にて 3 日間乾燥させた。上記の工程により、AN を用いて作製した CNF の複合体をダイヤモンドカッターにより切断して表面を研磨した。その後、0.05 wt% の AKD 溶液に 1 分浸漬し、乾燥後 100 °C で 10 分加熱し、試験片とした。得られた試験片を 36.5 °C、pH 7.4 の SBF に浸漬し、試料表面におけるアパタイト形成能を評価した。試験片表面を FE-SEM、EDX、TF-XRD を用いて観察および分析を行った。

### 【結果と考察】

AKD 処理前の CNF に 1 wt.%, 5 wt.% の AN を複合させて得られた試験片では、SBF に 1 日間浸漬すると、骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状の結晶の形成が部分的に観察された。しかし、AKD 処理後の CNF に 1 wt.% の AN を複合させて得られた試験片では、SBF に 1 日間浸漬後、アパタイト形成能は確認されなかった。また AKD 処理後の CNF に 5 wt.% の AN を複合させて得られた試験片では、SBF に 1 日間浸漬後、TF-XRD 測定によるアパタイトの回折ピークは検出されたものの、FE-SEM による試験片表面の観察では、試験片表面の一部分でのみアパタイトの形成が観察され、大部分が SBF 浸漬前と変化が見られなかった。CNF に 10 wt.% の AN を複合させて得られた試験片では、AKD 処理の有無にかかわらず、SBF に 1 日間浸漬後、FE-SEM により骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状の結晶の形成が試験片表面全体に観察され、EDX 測定における Ca と P のピーク強度が大きく増加した。また TF-XRD 測定においてもアパタイトの回折ピークが強く検出された。以上の結果から、AKD 処理を施した場合でも CNF に 10 wt.% 以上の AN を複合させて得られた試験片は、高いアパタイト形成能を持つことが示され、疎水化 CNF にアパタイト形成能を付与することは可能であることが分かった。

### 【参考文献】

- 1) T. Yao, M. Hibino, S. Yamaguchi, H. Okada, US Patent, US8,178,066 (2012), Japan Patent, 5261712 (2013).

### 【謝辞】

本研究の一部は、JSPS 科研費挑戦的研究 (萌芽) の助成により遂行した。

### Impartation of apatite-forming ability to hydrophobicized cellulose nanofiber by mixing with apatite nuclei

Takuya Yoshioka, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai

Graduate School of Energy Science, Kyoto University

Tel: +81-75-753-9129, Fax: +81-75-753-9115, E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

## アパタイト被覆による石膏系骨補填材の溶解制御および骨伝導性評価

九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野

○土谷 享, 佐藤 まりの, 石川 邦夫

【緒言】石膏系骨補填材は生体親和性が高く、骨再建に必要なカルシウムの遊離能力が高いことから長期間人工骨補填材として臨床的に利用されている。また、近年では抗生物質や成長因子を内包した薬物送達との併用等も研究されている。しかし一方で、石膏の生体内での溶解性は非常に速く、骨再建に必要な細胞の足場としての機能が失われるため、長期の骨再建は期待できないという欠点を有する。このような問題を解決するため、顆粒状の石膏表面に溶解性の低いアパタイトを被覆したアパタイト被覆石膏 (Ap/CS) 顆粒を調製し、石膏顆粒の溶解制御を試みた。溶解性の低いアパタイトで石膏顆粒の表面を被覆することで石膏の溶解性を抑制し、かつ、アパタイトの高い骨形成能力から Ap/CS 顆粒の骨形成能力が向上すると考えられる。

【実験】超硬石膏粉末を粉液比 0.2 となるように水で練和して石膏硬化体を調製し、粉碎後に 300-400  $\mu\text{m}$  にふるい分けして石膏 (CS) 顆粒を得た。CS 顆粒を 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液に 20°C, 60°C で 7 日間浸漬した。得られた顆粒は粉末 X 線回折 (XRD) により組成分析を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM) により表面形態を観察した。次に、顆粒を 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.5) に浸漬して 25°C で最大 7 日間振盪し、溶液中へのカルシウムの溶解量を評価した。骨伝導性評価は兔大腿骨に  $\phi 6 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$  の骨欠損をトレフィンバーにより作成して Ap/CSD 顆粒、比較対照群として CS 顆粒、焼結ハイドロキシアパタイト (s-HAp) 顆粒をそれぞれ埋入し、埋入 4 週後に  $\mu\text{CT}$  および脱灰組織切片のヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色により顆粒の溶解および新生骨形成量を評価した。

【結果と考察】CS 顆粒を 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液に浸漬した顆粒を SEM により表面形態を観察したところ、板状の結晶が顆粒表面に析出していた。得られた顆粒を XRD 解析したところ、アパタイト由来の  $2\theta = 25.9^\circ, 31.8^\circ$  のピークが検出されたことから、顆粒表面に析出した結晶はアパタイトであることが示唆された。また、エネルギー分散型 X 線分光法および赤外分光法により顆粒内部が CS、表面がアパタイトであることが示され、Ap/CS は CS 表面をアパタイトが覆ったサンドイッチ構造となっていることが示唆された。次に、CS 顆粒、Ap/CS 顆粒を 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.5) に浸漬したところ、CS 顆粒がカルシウムを急速に遊離して 1 時間で顆粒が消失したのに対し、Ap/CS 顆粒は顆粒からカルシウムを徐放し、浸漬 7 日後でも残存していた。また、60°C で調製した Ap/CS 顆粒は、20°C で調製した Ap/CS 顆粒よりも有意にカルシウムの遊離を抑制したことから、Ap/CS 顆粒の調製条件により顆粒の溶解速度を制御できることが示唆された。最後に、兔大腿骨に作成した骨欠損に Ap/CS 顆粒を埋入したところ、s-HAp 顆粒は埋入 4 週後に骨欠損部に残存していたのに対し、CS 顆粒、Ap/CS 顆粒は埋入 4 週後に生体内に吸収されていた。また、60°C で調製した Ap/CS 顆粒は CS 顆粒と比較して有意に骨形成量が向上しており、表面被覆していたアパタイトにより骨形成が促進したと考えられる。

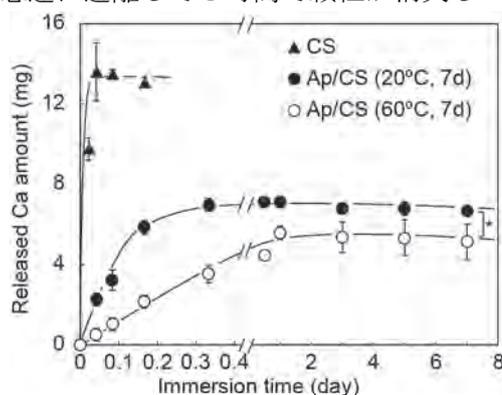


Figure 1 Ca release from granules into Tris-HCl buffer solution

### Regulating dissolution of calcium sulfate granules by apatite coating

Akira Tsuchiya, Marino Sato, Kunio Ishikawa

Department of Biomaterials, Kyushu University

Tel: +81-92-642-6346, Fax: +81-92-642-6346, E-mail: tsuchiya@dent.kyushu-u.ac.jp

## レーザーアブレーションで成膜した CaP 中の結晶性ハイドロキシアパタイト比率の評価

<sup>1</sup>産業技術総合研究所 電子光技術研究部門, <sup>2</sup>産業技術総合研究所 健康工学研究部門  
○屋代 英彦<sup>1</sup>, 梅林 信弘<sup>1</sup>, 欠端 雅之<sup>1</sup>, 伊藤 敦夫<sup>2</sup>

### 【緒言】

産総研ではレーザープロセスで表面修飾を行いセメントレスで骨固着を可能とするジルコニア製人工関節の研究を進めている。ジルコニアは生体親和性だけでなく、硬度、靱性、耐摩耗性等の機械強度に優れ、MRI 画像診断が可能な長所を有している。3%モル比イットリア安定化ジルコニア (3Y-TZP) 表面にフェムト秒レーザー照射でナノ周期構造の凹凸形成し[1]パルスレーザーアブレーションを利用して凹凸の表面に CaP 成膜を行うことで、生体内の骨固着も確認した。[2] さらに早期かつ強固な骨固着を実現させるには CaP 成膜中のハイドロキシアパタイト (HAp) の組成、結晶性、緻密性、密着性等が重要な項目の一つである。今回、3Y-TZP 基板上的成膜物質中における結晶性 HAp の存在比を標準物質となる多結晶粉末の顕微ラマン分光、X 線回折のスペクトルを用いて比較することで存在比を定量的に評価した。

### 【実験】

本研究では Nd:YAG レーザー第 4 高調波 (波長 266nm、パルス幅 10ns) を  $\beta$ -TCP (リン酸三カルシウム) に照射しアブレーション粒子を H<sub>2</sub>O ガス雰囲気中で 3Y-TZP に成膜した。大部分の粒子は融点を超え液滴として付着し成膜される。その際に  $\beta$ -TCP は  $\alpha$ -TCP と変化し高温度の 3Y-TZP 表面で加水分解と結晶化を行い結晶性 HAp へと変化する。この存在比を定量的に評価するために  $\beta$ -TCP (オリンパス生体グレード) を焼結して作成した  $\alpha$ -TCP 多結晶粉末および HAp (オリンパス生体グレード) 粉末を混合、分散させ約 10%毎に重量比を変えた標準試料を作成した。この標準試料のラマン分光、X 線回折のスペクトルを測定しスペクトルの強度比率に対する混合比を予め測定し、校正曲線を求めた。この曲線を利用して実際の成膜した物質を評価することで定量的な HAp の結晶化の温度、水蒸気圧力に依存性を求めた。

### 【結果と考察】

0.1Torr の H<sub>2</sub>O ガス雰囲気中で成膜した場合、3Y-TZP の基板温度が室温の場合、結晶性 HAp のスペクトルは全く観測されず、445°C でわずかに HAp 結晶の比率が上昇し、500°C 以上で 60% の存在比が観測された。そのため、H<sub>2</sub>O ガスの圧力依存性は基板温度を 500°C で固定し成膜を行った。レーザー照射時の衝撃で剥離した  $\beta$ -TCP が極わずかに付着した以外、全て HAp もしくは  $\alpha$ -TCP で他のリン酸カルシウムは確認されなかった。真空から H<sub>2</sub>O ガス圧力の上昇とともに加水分解により HAp の存在比は急激に上昇し、圧力 0.15Torr において約 80% が HAp 結晶に変化した結果が得られた。さらに圧力を上昇すると緩やかに HAp の比率が減少している結果が得られた。これは、放出されたアブレーション粒子のうち、小型の粒子は圧力上昇により基板まで到達せず、大型の粒子のみからなる粒度分布に変化したためだと考えられる。また、付着した粒子は周囲から HAp に変化するため径が大きいほど中心までの時間を要する。実験時の成膜レートでは中心まで変化する前に次の粒子が付着し、中心まで変化するのを阻害していると推測される。今後はアブレーション粒子の粒径を小さくする、基板温度の上昇により完全 HAp 結晶化ができると考えている。

### 【参考文献】

- [1] M, Kakehata, H. Yashiro, A. Oyane, A. Ito and K. Torizuka, LAMP2015, 15-017 (2015).  
[2] 屋代ら、第 37 回バイオマテリアル学会予稿、2E-20.

---

### Abundance ratio of hydroxyapatite in CaP layer deposited by pulse-laser ablation

Hidehiko Yashiro<sup>1</sup>, Nobuhiro Umebayashi<sup>1</sup>, Masayuki Kakehata<sup>1</sup>, Atsuo Ito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Electronics and Photonics Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,

<sup>2</sup>Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Tel: +81-29-861-5142, Fax: +81-29-861-3349, E-mail: [hidehiko.yashiro@aist.go.jp](mailto:hidehiko.yashiro@aist.go.jp)

## アパタイト核処理による Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金へのアパタイト形成能付与

<sup>1</sup>京都大学大学院エネルギー科学研究科, <sup>2</sup>京都大学エネルギー理工学研究所  
○藪塚 武史<sup>1</sup>, 城所 泰孝<sup>1</sup>, 高井 茂臣<sup>1</sup>, 八尾 健<sup>2</sup>

**【緒言】** β型チタン合金の一種である Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金は、耐腐食性および機械的強度に優れ、さらに従来の Ti-6Al-4V 合金よりも低い弾性率を有する。Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金に高いアパタイト形成能を付与することができれば、高機械的強度、低弾性率、高生体活性の 3 点を併せ持つ新規骨修復材料への展開が期待される。擬似体液 (SBF) [1] の温度および pH を調整することで、溶液中に微粒子状のリン酸カルシウム (アパタイト核) が析出する。我々はこれまでの研究において、生体不活性材料の基板に細孔を形成し、細孔内にアパタイト核を析出させることにより、アパタイト核がアパタイト形成を誘起し、基板表面全体がアパタイトで被覆されることを見出した [2-6]。本研究では、Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金に硫酸処理を施して細孔を形成し、その後アパタイト核を析出させることで Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金へのアパタイト形成能付与を試みた。

**【実験】** Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金基板を #400 の耐水研磨紙で研磨し、洗浄した。98 wt% 硫酸と蒸留水を混合した水溶液に基板を浸漬し、60 °C の恒温槽中で 24 時間静置した。その後、基板を蒸留水中で洗浄し、乾燥させた。硫酸処理後の基板表面を XRD、SEM、EDX で分析した。トリス緩衝剤を加えて 25 °C、pH 8.5 に調節した SBF を調製し、硫酸処理後の基板を浸漬した。その後、基板表面にアパタイト核を析出させるため、70 °C の恒温槽中で 24 時間静置した (以上の工程を「アパタイト核処理」と以後表記する)。アパタイト核処理後の基板表面を XRD、SEM、EDX で分析した。アパタイト核処理を施した基板表面におけるアパタイト形成能を評価するため、アパタイト核処理後の基板を SBF (pH 7.4, 36.5 °C) に浸漬し、基板表面を XRD、SEM、EDX で分析した。比較のため、硫酸処理のみを施した基板を SBF に浸漬し、同様の分析を行った。

**【結果と考察】** 硫酸処理後、基板表面にマイクロレベルの細孔が形成している様子が観察された。硫酸処理後の基板を SBF に 14 日間浸漬したところ、基板表面にアパタイトの形成は観察されなかった。

アパタイト核処理後の SEM および EDX 分析により、細孔内におよび基板表面にアパタイト核の析出が観察された。アパタイト核処理後の基板を SBF に 1 日間浸漬したところ、XRD において基板表面にアパタイトの回折ピークが  $2\theta = 26^\circ$  および  $32^\circ$  付近に検出された。アパタイトの回折ピーク強度は、SBF 浸漬期間が長くなるにつれ増加した、また、SBF 浸漬 1 日後における SEM 観察では、SBF 中で形成される骨類似アパタイトに特有の鱗片状結晶が基板表面全体を覆っている様子が確認された。また、EDX ではアパタイトの主要構成元素である P と Ca のピークが強く検出された。以上の SBF 試験の結果より、アパタイト核処理を施すことにより 1 日以内にアパタイト形成が誘起され、高いアパタイト形成能を示すことが示唆された。

### 【参考文献】

- [1] T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials*, **27**, 2907-2915 (2006).
- [2] T. Yao, M. Hibino, T. Yabutsuka, *US Patent* 8512732 (2013), *Japanese Patent* 5252399 (2013).
- [3] T. Yabutsuka et al., *Mater. Sci. Eng. C*, **81**, 349-358 (2017).
- [4] T. Yabutsuka et al., *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43**, 143-147 (2018).
- [5] T. Yabutsuka et al., *Materials*, **11**, 1334 (2018).
- [6] T. Yabutsuka et al., *J. Biomed. Mater. Res. B*, in press.

**【謝辞】** 本研究の一部は、第 34 回リバネス研究費 L-RAD 賞の助成により遂行した。

---

### Hydroxyapatite Formation Ability of Apatite Nuclei Treated Ti-15Mo-5Zr-3Al Alloy

Takeshi Yabutsuka<sup>1</sup>, Yasutaka Kidokoro<sup>1</sup>, Shigeomi Takai<sup>1</sup>, Takeshi Yao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Energy Science, Kyoto University

<sup>2</sup>Institute of Advanced Energy, Kyoto University

Tel: +81-75-753-9129 ext 16-9129, Fax: +81-75-753-9115, E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

## 種々の陽イオンを置換した水酸アパタイトセラミックスの作製と細胞応答性

<sup>1</sup> 明治大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup> 明治大学 研究・知財戦略機構  
○伊東 莉菜<sup>1</sup>, 横田 倫啓<sup>2</sup>, 相澤 守<sup>1</sup>

【緒言】ヒトの硬組織を構成している主な無機成分は水酸アパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp) であり、 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  および  $\text{OH}^-$  イオンに加えて、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  および  $\text{CO}_3^{2-}$  などの多くの微量元素を含んでいる。生物学的アパタイトは前述した微量元素が HAp へ置換することで、純粋な HAp と比較して高い生体活性を示すことが知られている。本研究では、硬組織中に含まれるミネラルの中で  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの次に多く含まれる  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の3種類の陽イオンに着目した。本研究では、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  の3種類の陽イオンを1種類ずつ置換したアパタイトを超音波噴霧熱分解法を用いて合成し、陽イオン置換アパタイトセラミックスを作製した。陽イオン置換アパタイトセラミックス中の陽イオンの違いによる材料と細胞応答への影響を調査したので報告する。

【実験】既報[1, 2]に準じて超音波熱分解法により陽イオン置換アパタイト粉体を合成した。使用した出発溶液の陽イオン濃度は、仕込み組成で HAp 中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に対して 5 mol% 一定となるように調製した。試料粉体の略号は置換した陽イオンから、MgAp, NaAp および KAp と表記する。得られた粉体を成形・焼成することで陽イオン置換アパタイトセラミックスを作製した。得られたセラミックスのキャラクタリゼーションを粉末 X 線回折法 (XRD)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-AES) などにより行なった。また、生物学的評価ではマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を陽イオン置換アパタイトセラミックスに直接播種し、細胞増殖性を調査した。また、陽イオン置換アパタイトセラミックスが間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に与える影響を調査するため、ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (RBMC) を各セラミックスに直接播種し、骨分化初期のマーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の定量を行なった。

【結果と考察】XRD の結果より、NaAp および KAp では HAp 単一相であったのに対し、MgAp では一部  $\beta$ -TCP 相も検出され、 $\text{Mg}^{2+}$  イオンの置換により HAp の結晶性が低下することがわかった。また、ICP-AES の結果より、MgAp および NaAp では各陽イオンは仕込み濃度である 5 mol% に近いイオン量が置換していたが、KAp 中に置換されていた  $\text{K}^+$  イオン量は仕込み濃度の約半分程度であり、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンよりイオン半径の大きい  $\text{K}^+$  イオンは HAp 中に置換されにくいことがわかった。また、陽イオン置換アパタイトセラミックス中に含有した陽イオンの溶出量の測定結果より、陽イオンの溶出量は HAp 中への置換濃度に依存し、 $\text{Mg}^{2+}$  および  $\text{Na}^+$  イオンは  $\text{K}^+$  イオンより溶出したことがわかった。

MC3T3-E1 細胞を用いて行なった細胞増殖性の結果より、各セラミックス上で培養した細胞の増殖には大きな差は見られなかった。RBMC を用いた骨分化評価として行なった ALP 活性の定量結果より、分化誘導後 7 日目において NaAp セラミックス上で培養した細胞が最も高い ALP 活性を示しており、置換した陽イオンは基材上での細胞増殖ではなく、骨芽細胞の分化の促進に影響を及ぼしていることがわかった。

以上のことから、今回調査した 3 種類の陽イオンにおいて  $\text{Na}^+$  イオンは初期段階において骨芽細胞の分化の促進に有用であることがわかった。

[1] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phosphorus Res. Bull.*, **20**, 61-78 (2006).

[2] T. Yokota, M. Honda and M. Aizawa, *Phosphorus Res. Bull.*, **33**, 35-40 (2017).

### Fabrication of cation-substituted hydroxyapatite ceramics and their *in vitro* evaluation

Rina Ito<sup>1</sup>, Tomohiro Yokota<sup>2</sup>, Mamoru Aizawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University, Kawasaki, Japan

<sup>2</sup> Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property Meiji University

Tel: +81-44-934-7237, Fax: +81-44-934-7906, E-mail: mamorua@meiji.ac.jp

## 新たな生分解可能な金属マトリックス複合材料とする亜鉛ヒドロキシアパタイトの研究

1国際先端科学技術研究機構, 熊本大学, 2-39-1黒髪中央区, 熊本 860-8555, 日本

○鄭 玉峰<sup>1</sup>, 阮 立群<sup>1</sup>, 高島 和希<sup>1</sup>

【緒言】金属マトリックス複合材料 (MMC) は、純 Zn の性能を改善する実現可能な方法である。MMC の利点は、適切に添加物を選ぶことによって、生体適合性だけでなく、腐食プロパティを調整の可能である。周辺の組織と MMC のインタラクションは、構成要素、補強フェーズのタイプおよび分布を変えることによって最適化できる。ヒドロキシアパタイト (HA) は、細胞増殖、骨の内植および骨性の整合をサポートする生物活性を持つ有名なバイオセラミックである。現在の研究において、Zn-HA は複合材料のスパークプラズマ焼結 (SPS) により形成された。整形外科のアプリケーションのために、生分解可能な移植として、微小组織、機械的性質、生体外腐食行為、細胞毒性、血液適合性、抗菌性のプロパティおよび生体内テストにおいて、生分解可能な Zn-HA 複合材料の性能を評価するために、系統的に研究された。

【実験】この純 Zn 粉 (99.9%、-140+325メッシュ) とヒドロキシアパタイト (HA) 粉 (99%、長さの150nm) は、原料として使われた。純 Zn 粉は、アルゴン (Ar) ガス雰囲気のある星型研磨機の中で、ボールミリングが300rpmとして1時間をかけて、HA 粉 (1、5、と10wt.%) と混ぜられた。そして、純 Zn 粉と混ぜられた Zn-HA 粉は、30mm 直径グラファイトダイスに入れられて、SPS-1050を利用する真空、380°Cの焼結温度および40MPa の焼結プレッシャーの条件で、6分間を保持して焼結された。焼結された純 Zn と Zn-HA 複合材料は、ディスクサンプル (Φ10×1 mm) とシリンダ (Φ2×4 mm と Φ2×5 mm) とそれぞれ切り分けられた。ディスクサンプルは、密度測定、微小组織、微小硬度、電気化学のテスト、浸すテスト、生体適合性、血液適合性および抗菌性のテストのために使われた。シリンダは、圧縮と動物性のテストのために使われた。

【結果と考察】焼結の後で、HA は Zn の境界で均一に分布された。腐食試験は、Zn と HA の双相組織のある特徴によって、Zn-HA 複合材料の生分解速度が調整可能であることを示した。さらに、Zn-HA 複合材料は、模擬人体の体液の中で、材料表面に  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  の形成を起こした。Zn-HA 複合材料は、純 Zn に比べて、造骨性の MC3T3-E1細胞の生存能力がかなり高められたことを示した。純 Zn と複合材料は、低い血栓症リスクと溶血率を表していた。効果的な抗菌性のプロパティはよく観察された。純 Zn と複合材料の Zn-5HA のポリウム損失は、8週間の埋め込みの後に、それぞれ1.7%と3.2%を減少した。組織学の分析では、第4週に純 Zn と複合材料 Zn-5HA の周りに新しく形成された骨を見つけて、まだ、時間の増加に従って、骨塊が増大した。延長された埋め込み時間の場合、複合材料 Zn-5HA は、新しい骨の形成を刺激することに対して、純 Zn より効果的であった。纏めますと、調整可能な生分解速度および改善する生体適合性を持つ Zn 基 MMC は、骨の修復に応用できる材料だと考えられる。

---

### Studies on zinc-hydroxyapatite composites as novel biodegradable metal matrix composite

Yufeng Zheng<sup>1</sup>, Liqun Ruan<sup>1</sup> and Kazuki Takashima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>International Research Organization for Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Chuo-Ku, Kumamoto 860-8555, Japan

Tel: +81-096-342-3405, Fax: +81-096-342-3405, E-mail: yfzheng@kumamoto-u.ac.jp

## ナノ表面構造による特異な「直交性骨基質配向化」機構

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>キャノンマシナリー株式会社  
 ○松垣 あいら<sup>1</sup>, 中西 陽平<sup>1</sup>, 川原 公介<sup>2</sup>, 二宮 孝文<sup>2</sup>, 沢田 博司<sup>2</sup>, 中野 貴由<sup>1</sup>

【緒言】構造材料としての骨力学機能は、骨配向性（アパタイト結晶集合組織）により支配される。生体骨は最適な骨機能発揮のために、骨部位や生体内外の環境に応じた骨配向性を発現する。一方で、疾患や損傷により失われた骨配向性の回復には長期間を要し、バイオマテリアルを駆使した細胞制御に基づく骨配向化誘導が必要不可欠である。当研究室ではこれまでに、材料表面形状制御により骨芽細胞配列パターンを自在に操ることで、骨アパタイトの秩序だった結晶学的配向性を作り出すことに成功している<sup>1)</sup>。一方で驚くべきことに、金属材料表面をナノオーダーで制御することにより、従来の科学的常識を根底から覆し、細胞方向に垂直に配向化した骨基質を形成することを初めて見出した<sup>2)</sup>。こうした「直交性骨基質配向化」機構の解明は、部位に応じて異なる配向方向・配向度を有する骨の自在な配向化誘導を可能にすると期待される。本研究では、材料表面形状のスケールに応じた「直交性」「平行性」の二つの相反する骨基質配向化機構について、遺伝子レベルからその配向化機構解明を目的とする。

【実験】Ti-6 mass% Al-4 mass% V 合金 (Ti-6Al-4V; ASTM F136-08) 表面に、フェムト秒レーザー (パルス幅; 250 fs, 中心波長; 800 nm) の直線偏光照射により自己組織的に形成される波長オーダーの微細周期構造 (レーザー誘起周期表面構造; LIPSS) を形成した。対照群として、鏡面研磨 (Ra<0.01 μm) 基板および表面粗さを保ちつつ指向性を持たない円偏光基板を作製した。走査型プローブ顕微鏡 (SPM) および走査型電子顕微鏡 (SEM) により表面形状解析を行った。マウス新生児頭蓋冠より単離した初代骨芽細胞を基板上で培養し、初期接着に基づく細胞配向性および細胞骨格タンパク質・接着斑の形態を免疫細胞化学にて定性的・定量的に解析した。長期培養では、石灰化誘導を行い、レーザーラマン顕微鏡によりコラーゲン配向性を、微小領域 X 線回折法によりアパタイト結晶配向性を解析した。Total RNA 抽出後、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析により、各群間における遺伝子発現比較を定量的に解析した。短期的遺伝子発現抑制にはエレクトロポレーションによる siRNA 導入、長期的発現抑制には Accell siRNA 導入を用いた。

【結果と考察】鏡面および円偏光基板に比較して、LIPSS 上でのみ有意に骨芽細胞の配列化が達成された。細胞はナノ周期構造に沿って優先配列した一方、細胞方向に垂直方向へのコラーゲン／アパタイト形成が明らかとなった。興味深いことに、LIPSS 上では溝方向に長く伸展した接着斑が発達した一方、円偏光・鏡面基板上では比較的等方的な形態の接着様式を示した。こうした結果から、接着斑成熟化が細胞配列化とともに、骨基質配向化を制御する可能性が示唆された。マイクロアレイ解析に基づき、細胞接着、直交性骨基質配向化に関連する遺伝子の同定に成功した。特に、接着斑構造・機能制御に関わる遺伝子の関与が認められ、新規の骨基質配向化制御機構の存在が明らかとなった。

### 【参考文献】

- 1) A. Matsugaki, T. Nakano et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*, 103 (2015), 489-499.
- 2) A. Matsugaki, T. Nakano et al., *Biomaterials*, 37 (2015), 134-143.

---

### Unique arrangement of bone matrix orthogonal to osteoblast alignment controlled by focal adhesion organization

Aira Matsugaki<sup>1</sup>, Yohei Nakanishi<sup>1</sup>, Kosuke Kawahara<sup>2</sup>, Takafumi Ninomiya<sup>2</sup>, Hiroshi Sawada<sup>2</sup>, Takayoshi Nakano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University <sup>2</sup> Canon Machinery Inc.

Tel: +81-6-6879-7505, Fax: +81-6-6879-7505, E-mail: [nakano@mat.eng.osaka-u.ac.jp](mailto:nakano@mat.eng.osaka-u.ac.jp)

## 水溶液中での生体吸収性マグネシウム合金の結晶性リン酸カルシウム被覆と耐食性の評価

京都大学大学院エネルギー科学研究科  
○渡邊 慎, 藪塚 武史, 高井 茂臣

### 【緒言】

マグネシウム(Mg)合金は生体吸収性と低弾性率を併せもつ次世代の金属生体材料として近年注目を集めている。しかしながら、Mgは塩化物イオン存在下で顕著に腐食が進行するため、in vivoでの腐食速度が速すぎて患部治癒まで必要な強度を維持することができず、医療分野への応用には課題がある。リン酸カルシウム(CaP)により合金表面を被覆することができれば、適当な生体吸収性と骨結合性を併せ持つインプラント材料を開発することができる。Mg合金のCaP被覆のための様々な手法が検討されているが、その多くにCaPの結晶化のために熱処理が用いられる。これはMg基板から生じるMgイオンがアパタイトの結晶成長を阻害するためである[1]。筆者らはこれまでに、陽極酸化を前処理として用いることで擬似体液(SBF)を基に組成を変更した水溶液中で常温・常圧下でのMg合金の結晶性リン酸カルシウム被覆に成功した[2]。本研究では、さらに組成を変更した反応溶液を用いることでMg合金のCaP被覆を試みた。CaP形成過程での表面及び断面形状の変化を観察し、インピーダンス測定によりin vitroでの耐食性を評価した。

### 【実験】

1.0M NaOH水溶液を電解液として定電圧10 Vを10分間印加し、Mg合金(AZ-31)に陽極酸化を施した。ヒトの血漿の3倍の濃度となるよう、7.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ および3.0 mM  $\text{HPO}_4^{2-}$ の濃度をもつ水溶液を調製した。この水溶液を以後CaP溶液と称する。続いて、陽極酸化後および未処理のAZ-31を36.5 °C pH 5.0および6.0のCaP溶液に浸漬し、36.5 °Cの恒温槽中で1日間静置した。取り出した試料は純水ですすいだ後、室温で風乾した。作成した試料表面および断面をTF-XRD, FE-SEM, EDXで測定した。また試料の耐食性はPBS中でのインピーダンス測定で評価した。

### 【結果と考察】

CaP溶液浸漬後、陽極酸化と未処理の両方について1日以内に試料表面全体が板状結晶により被覆された。EDXではCaおよびPが右翼検出された。この結果から、CaP溶液を用いることで陽極酸化の有無にかかわらずCaPがMg合金上に形成することがわかった。断面SEM像およびEDXラインスキャンから、小さいCaP結晶からなる薄い層の上に大きいCaP結晶からなる厚い層が形成していることがわかった。XRD測定では、OCPおよびアパタイトに帰属される回折ピークが複数検出された。このような異なる二層からなるCaP層は以下のような機構で形成したと考えられる。まず、Mg合金の腐食により合金表面近傍の反応溶液のpHが初期に調整した値から上昇し、アパタイト形成が進行した。これにより形成したアパタイト層がMg合金の腐食とそれによる局所的なpH上昇を抑え、初期に調整したpH環境下でOCP層がアパタイト層の上に形成した。CaP被覆試料のインピーダンスは未被覆試料と比べて顕著に高い値を示した。この結果から、CaP被覆によりMg合金の耐食性が向上したことが示唆された。

### 【参考文献】

- [1] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti and N. Rovveri, J. Inorg. Biochem 49 (1993): 69-78.  
[2] S.Watanabe, T.Yabutsuka, S.Takai, Bioceramics 29 (2017): 81-85.

---

### Crystalline Calcium Phosphate Coatings on Biodegradable Magnesium Alloy in an Aqueous Solution and Evaluation of the Corrosion Resistance.

Shin Watanabe, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai

Graduate School of Energy Science, Kyoto University

Tel: +81-75-753-9129, Fax: +81-75-753-9115, E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

## ミネラル複合化リポナノカプセルを用いた硬組織修復用材料の作製

慶應義塾大学大学院理工学研究科  
○多部田 郁絵, 福井 有香, 藤本 啓二

【緒言】近年、高齢化社会への移行と生活習慣の変化に伴い、骨粗鬆症、歯周病など硬組織関連疾患が増加している。これら疾患に対する予防用および治療用材料の開発が求められている。われわれはこれまでに、リポソーム表面にバイオポリマーからなるカプセルウォールを形成することでカプセル素材(リポナノカプセル)を作製してきた。本研究では、リポナノカプセル表面を反応場として、骨や歯など硬組織成分であるリン酸カルシウム(CaP)を生成することでミネラル複合化リポナノカプセルを作製し、これらを組織化することで硬組織修復用材料の開発を目指した。

【実験】カチオン性多糖であるキトサン(CHI)に五酸化二リンを反応させて、リン酸化度の異なるリン酸化キトサン(P<sub>CHI</sub>)を作製した。次に、カプセルの基材として、粒径が約 100 nm のカチオン性のリポソーム(Lipo<sup>+</sup>)を作製した。P<sub>CHI</sub> がアニオン性を示す pH 7.0 において Lipo<sup>+</sup>表面に P<sub>CHI</sub> の吸着を行い(Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub>)、動的光散乱法による水中粒径測定、表面電位測定を行った。得られた Lipo-P<sub>CHI</sub> の硬組織付着性を検討するために、Hydroxyapatite (HAp)粉体に Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub> を加えてインキュベート(37°C、24 時間)を行った。次に、HAp 粉体をリン酸緩衝液(PB)でリンスを行い、Nile Red によって Lipo(+)-P<sub>CHI</sub> を染色して蛍光顕微鏡観察を行った。また、Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub> 表面に CaP 層を形成させるために、Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub> 分散液を CaCl<sub>2</sub> 水溶液と PB に対して 60 min 毎に交互に透析を繰り返し、pH、温度、イオン濃度などを調節することで CaP 結晶の構造制御を試みた。得られたミネラル複合化リポナノカプセル(Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub>-CaP)について、透過型電子顕微鏡(TEM)による形状観察、X 線回折(XRD)による結晶構造の解析を行い、Ca<sup>2+</sup>量から CaP の生成量を求めた。次に、硬組織修復用材料への応用を見据えて、Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub>-CaP を集積化し、CaP 飽和水溶液中でインキュベート(37°C)することで CaP の成長とカプセルの組織化を試みた。

【結果と考察】得られた P<sub>CHI</sub> はアミノ基に加えて、CaP と親和性を有するリン酸基を有するため両性を示した。リン酸化度が 0.8 と 1.2 の P<sub>CHI</sub> (P<sub>CHI</sub><sup>0.8</sup>, P<sub>CHI</sub><sup>1.2</sup>) を Lipo<sup>+</sup>に吸着させたところ、粒径はいずれも 100~120 nm となった(Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub><sup>0.8</sup>, Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub><sup>1.2</sup>)。また、pH 7.4 における表面電位はそれぞれ-12.8 mV と-27.5 mV になり、リン酸基が表面に提示されていることが示唆された。HAp 粉体への付着性を検討したところ、Lipo<sup>+</sup>はリンスによって HAp から脱着したが、Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub>は表面のリン酸基と HAp が相互作用することで高い付着性を示した。次に、交互透析法(イオン濃度 5 mM, pH6.0, 37°C)を行ったところ、Lipo<sup>+</sup>では内部に CaP の生成が観察されたが、Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub>では、主としてカプセル部で CaP が成長して中空構造となり、カプセルの集合化がみられた(Fig. 1)。CaP の析出量は、Lipo<sup>+</sup><Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub><sup>0.8</sup><Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub><sup>1.2</sup>の順に増大した。これは、カプセル表面のリン酸基量が多いほど Ca<sup>2+</sup>の保持能が高く、CaP の生成と成長を促進したと考えられる。基材の Lipo<sup>+</sup>に生成する結晶は主として HAp であったが、P<sub>CHI</sub>由来のリン酸基が表層に増えるほど、テンプレート効果によって準安定相の結晶構造となる傾向が見られた。次に、Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub><sup>1.2</sup>-CaP の組織化を行ったところ、CaP が生成・成長してカプセル間が架橋されることでハイブリッド構造体が得られた。本研究で作製したミネラル複合化リポナノカプセルには、骨欠損部への注入による CaP 成長による硬化と骨形成促進が期待できる。

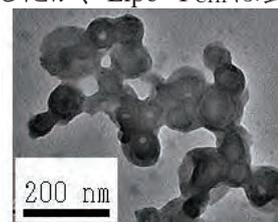


Fig. 1 TEM image of Lipo<sup>+</sup>-P<sub>CHI</sub><sup>1.2</sup>-CaP produced by the alternative dialysis

### Mineralization of Hybrid Liponancapsules for Hard Tissue Repair and Regeneration

Ikue Tabeta, Yuuka Fukui, Keiji Fujimoto

Graduate School of Science and Technology, Keio University

Tel: +81-45-566-1580, Fax: +81-45-566-1551, E-mail: fujimoto@apple.keio.jp

## Preparation of stepwise adipogenesis-mimicking 3D ECM scaffolds and their effects on adipogenic differentiation of hMSCs

Yazhou Chen<sup>1,2</sup>, Naoki Kawazoe<sup>1</sup>, and Guoping Chen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan

<sup>2</sup> Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan

Tel: 029-860-4496, \*Correspondence: [Guoping.CHEN@nims.go.jp](mailto:Guoping.CHEN@nims.go.jp)

**【Introduction】** Cellular interaction with the surrounding extracellular matrix (ECM) can directly or indirectly regulate many cell functions such as cell adhesion, proliferation, cell migration, and differentiation. ECM has a complex composition and structure with robust bioactivity and good biocompatibility. Previous studies have shown that three-dimensional (3D) ECM constructs can be widely used for tissue engineering due to their similarity to native microenvironment. Although the previous studies have demonstrated that 3D ECM constructs have the advantage of similarity to native microenvironment, they did not mimic dynamic changes of EMC during cell development. In the present study, we prepared stepwise 3D ECM scaffolds to mimic *in vivo* ECM microenvironment changes during adipogenic differentiation of humun bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) and used them for 3D culture of hMSCs.

**【Materials and Methods】** A PLGA-collagen 3D hybrid scaffold was prepared by hybridization of a PLGA mesh with collagen microsponges. A vicryl knitted mesh made of polyglactin 910 (a 90:10 copolymer of glycolic acid and lactic acid) was immersed in a 0.5 wt % type I bovine collagen acidic solution (pH 3.0), and frozen at -80 °C for 12 h. It was then freeze-dried for 24 h to allow the formation of collagen microsponges. The hybrid scaffold was cross-linked using EDC/NHS chemistry. The hMSCs were seeded in the hybrid scaffolds, cultured in adipogenic medium for 3 and 14 days to control the adipogenic differentiation of hMSCs at early and late stages, respectively. The cell/scaffold constructs were decellularized by repeated freezing/thawing to prepare early and late stage adipogenesis-mimicking ECM scaffolds (EA-ECM and LA-ECM). The cell/scaffold constructs obtained by culturing hMSCs in the hybrid scaffold with basal medium were used to prepare stem cell stage ECM (SC-ECM). All the

ECM scaffolds were characterized by SEM, immunostaining and used for investigation of *in vitro* adipogenesis of MSCs.

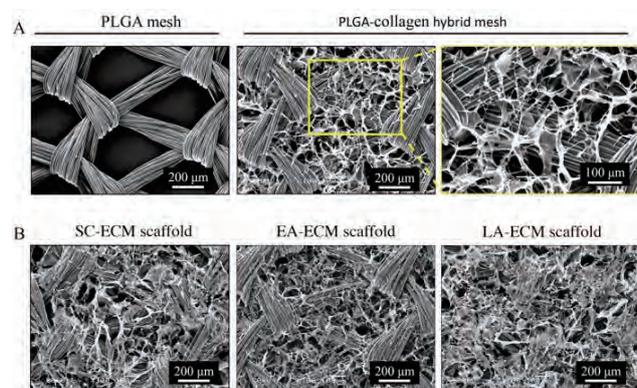


Fig. 1. (A) SEM images of PLGA mesh and PLGA-collagen hybrid mesh. (B) SEM images of SC-ECM scaffold, EA-ECM scaffold and LA-ECM scaffold.

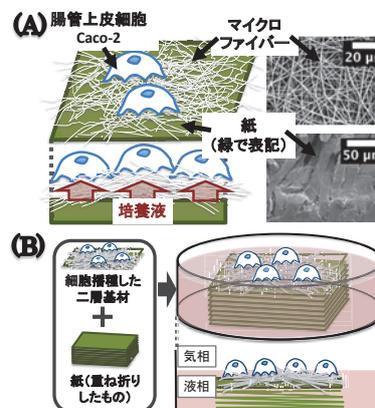
**【Results and Discussion】** SEM observation showed that the SC-ECM, EA-ECM and LA-ECM scaffolds had similar microporous structures to that of PLGA-collagen hybrid scaffold (Fig.1). Immunostaining results showed that the stepwise 3D ECMs scaffolds had different composition depending on the differentiation stage of MSCs. *In vitro* culture results of hMSCs indicated that all the stepwise 3D ECM scaffolds supported cell adhesion, viability, and proliferation over 7 days. Gene expression analysis revealed that hMSCs cultured in the EA-ECM scaffold expressed higher level of adipogenic genes that did the cells cultured in the LA-ECM and SC-ECM scaffolds. The stepwise 3D ECM scaffolds showed different effects on the adipogenic differentiation of hMSCs.

## 紙とマイクロファイバーの二層基材での気液界面培養による腸管上皮モデル組織の作製

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

○長澤真理, 今任景一, 武田直也

【緒言】近年、医薬品や食品等の安全性評価において、倫理やコストの観点から動物実験の代替法として腸管上皮モデル組織を用いた評価が行われている。しかし、従来の腸管上皮モデル組織は、二次元構造であることや十分な機能を有さないことから、生体を十分に模倣しているとは言い難い。より有用な腸管上皮モデル組織の作製には、生体環境を模倣した培養法が有効であり、これまでに灌流刺激や伸縮刺激を付与する培養法が開発されてきた。このような背景の中、本研究では、生体内において腸管上皮細胞が管腔の気相に接することに着目した。そこで、紙とマイクロファイバーからなる培養基材（二層基材）を作製し、簡便かつ安定的な気相-液相界面での培養（気液培養）を実現すると共に、構築した腸管上皮モデル組織の形態や機能を詳細に評価した。



【実験】二層基材の上層には、細胞を安定に接着させるために、生体由来でRGD配列を有するゼラチンのマイクロファイバーを用い、通液性も持たせた。下層には、高い吸水力による培地の保持と細胞・組織底面のみからの培地の供給を実現するために、紙（ペーパータオル）を用いた（Figure 1A）。この基材は、回転するドラムコレクター（回転速度 100 rpm）に巻きつけた紙を標的に、エレクトロスピンニング法によってマイクロスケールのゼラチンファイバーを紡糸して作製した（平均直径  $0.78 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ）。続いて、二層基材は、グルタルアルデヒドの蒸気に一晩曝露し、さらに  $100^\circ\text{C}$  の熱処理を施すことで架橋した。この架橋による培養基材の安定性向上は、細胞培養液中に 14 日間浸漬して評価した。

続いて、二層基材にヒト腸由来の株化細胞 Caco-2 を播種し、培地に浸漬させる通常の液内培養および、折り重ねて培地を含浸させた紙上に設置することでの気液培養を行った（Figure 1B）。12 日間培養の後に生じた細胞構造体について、これら培養条件の違いによる形態の違いや、さらに上皮細胞特有の密着結合の形成と微絨毛の形成について評価した。さらに、アミノペプチダーゼ（ANPEP）の活性を測定することで、腸管上皮組織への分化と、モデル組織としての機能を有するかについて評価した。

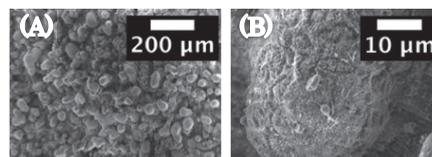


Figure 2. SEM images of the engineered gut model by air-liquid interface culture. (A) Villi-like 3D structure. (B) Microvilli at the apical surface.

【結果と考察】作製した培養基材は、細胞培養条件下においても、ファイバー径の大きな変化や形態変化は見られず、長期間安定であった。すなわち、安価で成形加工が容易な紙を基盤とし、長期培養にも耐え得る気液培養に適した基材を簡便に作製することに成功した。また、細胞培養実験では、気液培養においてのみ、小腸に特有の絨毛構造様の三次元構造体（高さ約  $60 \mu\text{m}$ ）の形成を確認した（Figure 2A）。この構造体を形成した Caco-2 の apical 面には、腸管上皮細胞へ分化したことを示す微絨毛もみられた（Figure 2B）。さらに、従来のモデル組織と同程度のアミノペプチダーゼ活性を示した。これらの結果から、二層基材による気液培養は、より生体に近い形態を持ち、従来モデルと同程度の機能を示す腸管上皮モデル組織の構築に有用なことが示された。

### Fabrication of Engineered Gut Model Induced by Air-liquid Interface Culture Using Dual-layered Scaffold Composed of Paper and Gelatin Microfibers

Mari NAGASAWA, Keiichi Imato, Naoya Takeda

Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University (TWIns)

Tel: +81-03-5369-7323, Fax: +81-03-5369-7323, E-mail: [ntakeda@waseda.jp](mailto:ntakeda@waseda.jp)

## 弾性率と生分解性を独立して制御可能なシルクゲルの開発

<sup>1</sup> 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部, <sup>2</sup> 関西大学 化学生命工学部  
 ○溝口 裕二<sup>1,2</sup>, 神戸 裕介<sup>1</sup>, 平野 義明<sup>2</sup>, 山岡 哲二<sup>1</sup>

**【緒言】** 欠損した生体組織を補填し、再生させる移植用ハイドロゲルには、周囲の力学ストレスに耐え、移植領域の体積を維持できる弾性率と、徐々に再生組織に置換される生分解性が重要である。我々は心筋梗塞ゲル注入療法に着目し、研究を行っている。梗塞した心筋の弾性率が約 50 kPa であることより<sup>1)</sup>、ゲルの弾性率は 10~250 kPa で制御するのが望ましい。一方、非生分解性のゲルを注入した場合、注入後 4 週で改善した心機能が 13 週で再び悪化するので<sup>2)</sup>、生分解性は 4~13 週あるいはそれ以上の制御が望ましい。また、最適なゲルの性質の解明には、ゲルの化学組成を変えず、両性質を独立して制御する必要がある。家蚕が産生するシルクフィブロイン (SF) から成るゲルは、濃度により、1~6,000 kPa の弾性率を示す<sup>3)</sup>。また、SF スポンジは、加工プロセスにより、2 ヶ月~1 年の生分解性を示す<sup>4)</sup>。それ故、SF ゲルは、その化学組成を変えず、心筋梗塞ゲル注入療法に求められる弾性率と生分解性をカバーすると考えられるが、一般的に両性質は独立ではない。本研究は SF ゲルの弾性率と生分解性を独立して広範囲に制御することを目指した。なお、SF のゲル化は、化学架橋法ではなく、超音波照射による物理架橋法<sup>5)</sup>を採用した。

**【実験】** SF 水溶液をオートクレーブ処理 (121°C, 15 分, 100 kPa ; 1, 2 回) し、濃度を調製した (2, 4, 5, 6, 8 w/v%)。SF 水溶液に超音波照射 (10, 20, 30 秒, amplitude 21%) を行い、SF ゲルを得て、弾性率を測定した。SF 濃度/超音波照射時間—弾性率の関係から約 10, 50, 250 kPa の弾性率を示すゲルの濃度/超音波照射時間条件を予測し、実際に弾性率を測定した。結果、E<sub>Low</sub> (5~10 kPa), E<sub>Middle</sub> (40~53 kPa), E<sub>High</sub> (220~300kPa) の弾性率を示す 3 群を得た。3 群の SF ゲルを 5 mg/mL パイン溶液に浸し、酵素分解試験を行った。ゲルの重量を経時的に測定し、*in vitro* での分解速度 (%/h) を得た。この値を、予め得ておいた *in vitro* 生分解性—*in vivo* 生分解性の関係を用いて、*in vivo* の生分解性に換算した。

**【結果と考察】** E<sub>Low</sub>, Middle, High 群の弾性率と *in vivo* での分解速度の関係を Fig. 1 に示す。E<sub>Low</sub>, Middle, High 群のゲルの *in vivo* での分解速度を見積もると、E<sub>Low</sub> 群で >100  $\mu\text{m}/\text{week}$ , E<sub>Middle</sub> 群で 30, 40, 50  $\mu\text{m}/\text{week}$ , E<sub>High</sub> 群で 30, 40  $\mu\text{m}/\text{week}$  となった。梗塞心筋に注入したゲルの厚さ (1 mm) を踏まえると、生分解性は、E<sub>Low</sub> 群で 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 週, E<sub>Middle</sub> 群で 9.5, 10.5, 13, 16 週, E<sub>High</sub> 群で 13.5, 16 週となる。これは、弾性率が同一 (約 50 もしくは 250 kPa) で生分解性が異なる (約 13 と 16 週) ゲル、また、弾性率が異なる (約 50 と 250 kPa) も生分解性が同一 (約 13 もしくは 16 週) のゲルが得られた。よって、弾性率と生分解性を独立して制御できた。

しかし、両性質の制御範囲狭かった。そこで現在、SF ゲルの架橋密度や結晶領域量に作用し得るペプチドを用いた修飾を行い、SF ゲルの弾性率と生分解性の広範囲制御を試みている。

**【参考文献】** 1) J Biomech 2010;43:93-8, 2) J Card Fail 2009;15:629-36, 3) Biomacromolecules 2004;5:786-92, 4) Biomaterials 2008;29:3415-28, 5) Biomaterials 2008;29:1054-64

### Silk hydrogels with independently-tunable compressive modulus and biodegradation rate.

Yuji MIZOGUCHI<sup>1,2</sup>, Yusuke KAMBE<sup>1</sup>, Yoshiaki HIRANO<sup>3</sup> and Tetsuji YAMAOKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

<sup>2</sup>Graduate School of Science and Engineering, Kansai University

<sup>3</sup>Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

<sup>1</sup>Tel : +81-6-6833-5012, FAX : +81-6-6835-5476, E-mail : ykambe@ncvc.go.jp

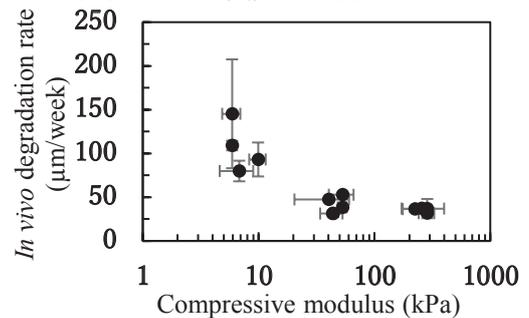


Fig.1 Relationship between the compressive modulus and *in vivo* biodegradation rate of SF gels.

## 羊毛ケラチン薄膜の作製

大阪府立大学 大学院理学系研究科生物科学専攻 細胞組織工学研究室, ○原 正之, 森 英樹

### 【緒言】

我々は羊毛などの主成分であるケラチンを抽出・加工し、組織工学の足場材料に用いる研究を行っている。細胞接着性に優れ、加熱蒸気滅菌（オートクレーブ）も可能な羊毛ケラチンの多孔質ゲルを以前に報告したが、今回はこれを物理的に圧縮して透明な薄膜を作製した。ケラチン薄膜の物性と分解性などを評価した結果を報告する。

### 【実験】

羊毛ケラチンを 8 M 2-mercaptoethanol と 1.66 M guanidine の水溶液で、60°Cで 18 時間可溶化し、得られた粗抽出液を常温で純水 6 時間透析して、円板状のケラチン多孔質ハイドロゲルを得た（以下、ゲル）。これを直径 1.4 cm の円形にくり抜き、油圧圧縮装置を用いて 28MPa で圧縮処理し、ガラス板に挟んで乾燥させ、透明なケラチン薄膜を得た（以下、薄膜）。この薄膜の光透過率の測定、AFM 観察を行い、また 0.05% (w/v) トリプシン溶液に浸し、1, 3, 6 週目で乾燥・湿潤重量を測定して分解性を評価した。対照には圧縮前のケラチン多孔質ゲル、非分解性の polyethylene terephthalate (PET) 薄膜を用いた。同様の試料を ICR マウスの皮下へ移植し、3 日、1, 3, 6, 10 週目に残存試料を含む皮下組織を採取し、凍結切片を作製して HE 染色後に顕微鏡で観察した。

### 【結果と考察】

不透明な多孔質ゲルを物理的に圧縮する方法で、光透過率 80%前後の透明な薄膜に加工できた。この薄膜は、ゲルに見られた細孔が殆どみられなくなり、丈夫になり、引張試験でもヤング率が上昇していた。不透明なゲル上では細胞の光学顕微鏡観察が全く不可能だが、透明な薄膜上では可能であることが確かめられた。また、live/dead 染色により細胞の生存試験を行った結果、接着した培養細胞は、ゲル、薄膜とも良好な生存性を示した。加熱蒸気滅菌すると、薄膜の透明度は再度若干低下した。6 週間のトリプシン処理ではゲルは脆くなり、乾重量では初期値の約 40%に減少したが、薄膜は初期値の 85%程度に留まった。マウス皮下に移植したゲルでも重量、面積ともに大幅に減少したが、薄膜は乾重量の減少が少なかった。薄膜は圧縮処理により隙間の表面が減少し、ゲルと比較して蛋白質分解酵素への耐性が高まった為と思われる。また炎症反応も PET 薄膜と同様に 3 週目に沈静化しており、PET 製の移植用材料と同程度の生体適合性であると考えられた。我々は透明なケラチン薄膜の生体材料としての利用可能性が示されたと考えている。

### 【参考文献】

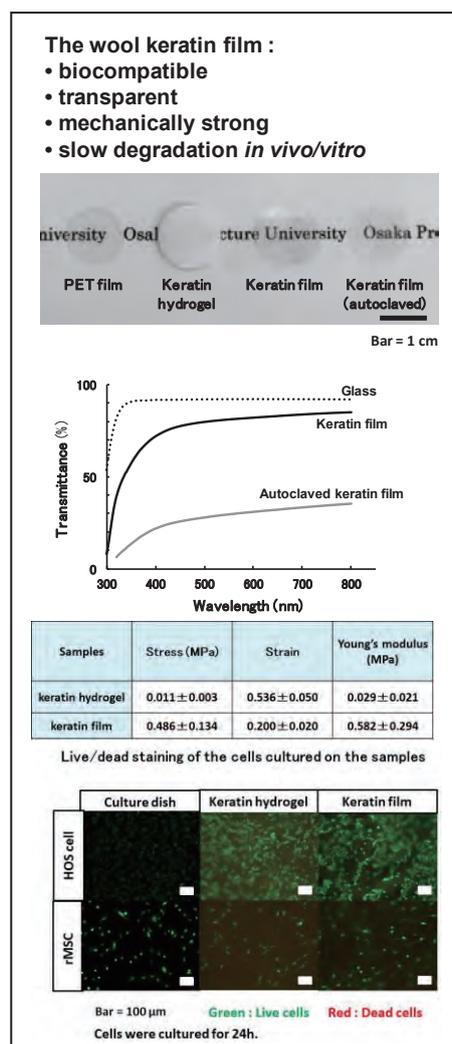
H. Mori et al., *Mater. Sci. Eng. C* 91, 19–25 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.021>

### Transparent biocompatible wool keratin film

Hideki Mori, Masayuki Hara

Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570, Japan

Tel: +81-72-254-9842, Fax: +81-72-254-9842, E-mail: [hara@b.s.osakafu-u.ac.jp](mailto:hara@b.s.osakafu-u.ac.jp)



## 凍結乾燥生体由来材料の復元及び機能化への真空加圧含浸技術の応用

<sup>1</sup> 信州大学繊維学部, <sup>2</sup> 東京医科歯科大学生体材料工学研究所, <sup>3</sup> 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点, 物質・材料研究機構

○根岸 淳<sup>1</sup>, 橋本 良秀<sup>2</sup>, 岸田 晶夫<sup>2</sup>, 船本 誠一<sup>2,3</sup>

【緒言】生体由来材料は、金属や無機材料などと比べて劣化しやすく保存期間が短いという問題がある。細胞含有材料は、細胞生存のため冷蔵保存が選択されるが、細胞を含有していない脱細胞化組織や天然高分子製材料は、冷蔵、冷凍や凍結乾燥保存が可能である。凍結乾燥保存は、長期保存や輸送コストを低く抑えることが期待できるため、様々な凍結乾燥生体由来材料が開発されている。凍結乾燥脱細胞化ヒト真皮などは、生理食塩水復元してから使用されているが、より厚みのある材料の場合、復元が不十分になることが懸念されている。

本研究では、金属加工や食品加工分野で利用されている真空加圧含浸技術を用いて、種々の凍結乾燥脱細胞化生体組織の迅速で高効率な復元法の開発に取り組んだ。さらに、真空加圧含浸技術を用いて、凍結乾燥脱細胞化組織に薬剤を導入、機能化することを目指した。

【実験】高静水圧法を用いて、ブタ皮膚、大動脈、角膜を脱細胞化处理し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥脱細胞化組織を作製した。真空加圧含浸処理として、真空容器内の真空下で凍結乾燥脱細胞化組織と溶液を接触させ、その後、凍結乾燥脱細胞化組織を溶液に浸漬して、静水圧を印加した。

凍結乾燥脱細胞化組織の各処理前後の重量測定から溶液導入率を算出し、組織学的染色により構造を評価した。また、トルイジンブルー含有生理食塩水とローダミン標識 PEG を用いて、凍結乾燥組織内部への溶液導入を所見評価した。

さらに、真空加圧含浸技術による生体由来材料の機能化として、凍結乾燥脱細胞化大動脈に抗血栓薬のヘパリン溶液を導入した。ヘパリン導入した脱細胞化大動脈を生理食塩水に浸漬、一定時間経過後の生理食塩水を用いて Lee-White 試験を行い抗血栓性を評価した。

【結果と考察】すべての脱細胞化組織の生理食塩水復元において、浸漬処理と比較し、真空加圧含浸処理で溶液導入率が高いことが明らかになった。組織学的染色から、浸漬処理では組織内部の残存空気が認められたが、真空加圧処理では空気の残存は認められなかった。また、トルイジンブルー含有生理食塩水導入後の脱細胞化組織の断面観察では、浸漬処理では内部まで色素は達していなかったが、真空加圧含浸処理では組織内部まで色素が到達していた。同様に、ローダミン標識 PEG 導入後の脱細胞化生体組織も、浸漬では表面のみにローダミンが検出されたが、真空加圧含浸処理では組織全体にローダミンが検出された。

凍結乾燥脱細胞化大動脈へのヘパリン導入試験において、浸漬処理と比較し、真空加圧含浸処理により脱細胞化大動脈全体にヘパリンが導入されたことが確認された。また、浸漬処理ではヘパリン溶出が3時間で終了し、真空加圧含浸処理では12時間以上ヘパリンが溶出していた。

真空加圧含浸技術は、真空状態で材料と溶液を接触させ、その後、加圧処理することで溶液を材料内部まで浸透させる技術である。溶液への浸漬処理では、凍結乾燥脱細胞化組織内部の空気により溶液浸潤が阻害されたが、真空加圧含浸では空気が除去されていたため、高効率な溶液導入が可能になったと考えられた。また、空気阻害を回避し加圧処理により溶液を材料内部まで浸透させるため、PEG やヘパリンも組織内部まで導入できたと考えられた。

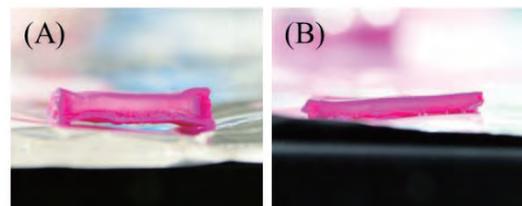


Figure 1. (A) Rhodamine-PEG immersed aorta and (B) Rhodamine-PEG VPI aorta.

### Application of a Vacuum Impregnation Technique for Rehydrating and Functionalizing Decellularized Tissues

Jun NEGISHI<sup>1</sup>, Yoshihide HASHIMOTO<sup>2,3</sup>, Akio KISHIDA<sup>2</sup>, Seiichi FUNAMOTO<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

<sup>2</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

<sup>3</sup>International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science

Tel: +81-268-21-5335, Fax: +81-268-21-5331, E-mail: jnegishi@shinshu-u.ac.jp

## シルクフィブロイン基材上での iPS 細胞の培養挙動

<sup>1</sup>信州大学 繊維学部, <sup>2</sup>国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部  
白川美徳<sup>1</sup>, 佐々木瑞樹<sup>1</sup>, 山岡哲二<sup>2</sup>, 〇玉田 靖<sup>1</sup>

## 【緒言】

iPS 細胞は、組織再生における細胞ソースとして期待され、すでに iPS 細胞から作製した再生組織による臨床治療が成功している。iPS 細胞を臨床的に用いる場合、 $10^6 \sim 10^8$  の細胞数が必要とされるために、iPS 細胞を未分化状態と多分化機能を維持したまま、多量に培養することが要求される。また、マウス繊維芽細胞をフィーダーや牛血清を用いる従来の培養法では、ヒト臨床には課題となるために、無血清や血清代替による培養液やフィーダーレスの培養基材の開発が活発に行われている。

シルクは、2500 年以上前から外科用縫合糸として現在も臨床的に使用されているバイオマテリアルであり、その生体安全性は高い。また、シルク（フィブロイン）スポンジ構造体が、関節軟骨欠損モデルにおいて、良好な軟骨形成を誘導する軟骨細胞のスキヤホールドになることや、シルク上で培養する細胞は培養初期において、その運動性が高く、それとともに細胞外基質の産生を up-regulate する、等の細胞に対する特異的な挙動を示すことが報告されている。従って、シルク基材が iPS 細胞培養基材として何らかの特異的な作用を示す可能性が期待できる。そこで、われわれは、iPS 細胞培養基材としてのシルクの評価を進めており、今回は、シルク基材上で培養した iPS 細胞のコロニー形成について報告する。

## 【実験】

シルク（フィブロイン）基材は、精練済み絹糸から常法に従いシルク水溶液を作製し、細胞培養用シャーレ上にコーティングすることで作製した。iPS 細胞は、理研 BRG より購入したマウス iPS 細胞（iPS-MEF-Ng-20D-17）を、マウス繊維芽細胞 SNL をフィーダーとした基材上で継代維持した細胞を用いた。iPS 細胞の未分化状態の確認は、Nanog-GFP の蛍光観察と Oct3/4 に対する免疫染色で行なった。また、軟骨細胞への分化は BMP-2 の添加により行い、アルシアンブルー染色により確認した。

## 【結果と考察】

シルク基材上で iPS 細胞を培養するとコロニー形成が観察され、そのコロニーは浮遊と接着の両状態が共存し、それらは可逆的であることがタイムラプス観察によって確認された。浮遊コロニーは培養時間とともにその個数は減少するものの継続的に形成され、同時に接着コロニー数も減少することから接着コロニーが浮遊した可能性も示唆される。コロニーサイズは、両コロニーとも培養時間とともに増加する傾向が観察されたが、60 日間の培養においても未分化状態が確認できた。浮遊コロニーの BMP-2 による軟骨細胞への分化は、長期培養したコロニーにおいても分化が確認できたが、培養初期の分化率に比較して培養期間とともにその分化率の低下が観察された。シルク基材の改変によるコロニー形成挙動の変化についても報告する。

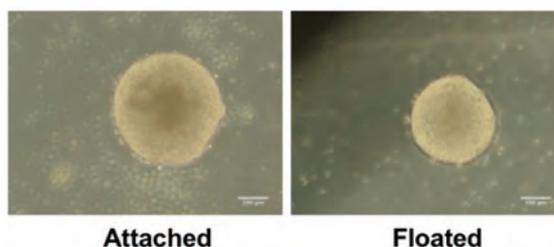


図 1 シルク基材上で培養した iPS 細胞コロニー

## Behavior of iPS cells cultured on silk fibroin substrate

Minori Shirakawa<sup>1</sup>, Mizuki Sasaki<sup>1</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>2</sup>, Yasushi Tamada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

<sup>2</sup> National Cerebral and Cardiovascular Center

Tel: 0268-21-5359, Fax: 0268-21-5331, E-mail: ytamada@shinshu-u.ac.jp

## 表面改変マクロファージによる生きたがん細胞の捕捉と消去

<sup>1</sup> 関西大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup> 関西大学化学生命工学部, <sup>3</sup> 関西大学 ORDIST  
 ○杉本 駿介<sup>1</sup>, 山内 柗平<sup>2</sup>, 大高 晋之<sup>3</sup>, 岩崎 泰彦<sup>2,3</sup>

【緒言】 近年、低侵襲ながん治療法として免疫細胞療法が注目されている。免疫系において中心的な役割を果たす抗原提示細胞(マクロファージ, 樹状細胞)は、貪食したがん細胞を特異的に除去する細胞障害性 T 細胞を誘導する。我々はこれまでに、がん細胞に親和性のある核酸アプタマーで表面改質したマクロファージを用いて、アポトーシスを誘導したがん細胞を効率的に捕捉させることにより、免疫応答を惹起できることを明らかにした<sup>1)</sup>。他方で、生きたがん細胞の表面には”don't eat me”シグナルとして作用する膜タンパク質(CD47)が発現しており、マクロファージによる貪食を回避する。最近、がん細胞ならびに免疫細胞の表面に存在するタンパク質が同定され、これをブロックする免疫チェックポイント阻害剤により、がん免疫が効果的に働くことが認められている<sup>2)</sup>。そこで本研究では、核酸アプタマーとともに抗 CD47 抗体をマクロファージの表面に化学修飾することにより、生きたがん細胞を効率的に捉え除去する免疫細胞の創出を図る。

【実験】 *N*-メタクリロイルマンノサミン (ManM)<sup>3)</sup> と共にマクロファージ(RAW264.7 細胞)を 1 日培養し、メタクリロイル基を RAW264.7 細胞の糖鎖末端に誘導した。このマクロファージを、Traut's 試薬処理によりチオール化した抗 CD47 抗体(clone ; B6H12, Cy5.5 で赤色染色)と緑色標識核酸アプタマー(Alexa488-sgc8-SH)、光ラジカル前駆体(Eosin-Y)を溶解させた PBS に浸し、可視光線(505 nm)を 10 分間照射した。細胞表面に修飾された抗体と核酸アプタマーの動態について共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターを用いて調査した。上記の手法で改変したマクロファージをヒト急性リンパ芽球性白血病細胞(CCRF-CEM)と共培養し、細胞間の接着や貪食率、サイトカイン(TNF- $\alpha$ )産生量について調べた。

【結果と考察】 蛍光標識した抗 CD47 抗体と核酸アプタマーを RAW264.7 細胞に添加したときの様子を観察したところ、ManM 処理を行わない場合では蛍光は認められなかった(Figure 1)。他方で、ManM 処理したとき RAW264.7 細胞の輪郭が強く蛍光染色された。このことから、ManM の存在下でマクロファージの表面に両分子を修飾できることが明らかとなった。次に、上記の RAW264.7 を CCRF-CEM 細胞と共培養した。その結果、ManM 未処理のマクロファージはがん細胞と接着せず、貪食が見られなかったが、抗体と核酸アプタマーが修飾されたマクロファージではがん細胞の接着が多数見られ、貪食率も時間経過に伴い増加した。マクロファージが異物を貪食した際に産生されるサイトカイン TNF- $\alpha$ についても調査したところ、両修飾 RAW264.7 細胞において顕著に産生が認められた。抗体と核酸アプタマーをマクロファージに修飾する本手法を用いることにより、がん細胞を効率的に捕捉・消去できることが示された。

【謝辞】 本研究は科研費(No. 17K20119)により実施された。

【文献】 1) S. Sugimoto et al., *Chem. Comm.* **2015**;51:17428. 2) P. S. Petrova et al., *Clin. Cancer Res.* **2017**;23:1068. 3) Y. Iwasaki et al., *Macromol. Biosci.* **2011**;11:1478.

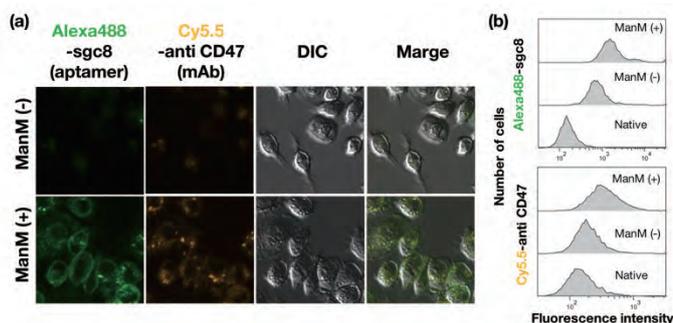


Figure 1 (a)Differential interference contrast (DIC) and laser scanning confocal (LSC) micrographs of RAW264.7 cells. The cells were treated after contact with Alexa488-aptamers and Cy5.5-anti CD47 antibodies. (b)Fluorescence intensity was determined by flowcytometry.

## Elimination of live cancer cells by surface-engineered macrophages

Shunsuke Sugimoto<sup>1</sup>, Shuhei Yamauchi<sup>2</sup>, Akihisa Otaka<sup>3</sup>, Yasuhoko Iwasaki<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Kansai University, <sup>2</sup>Department of Chemistry and Materials Engineering, <sup>3</sup>ORDIST, Kansai University

Tel: +81-(0)6-6368-0090, Fax: +81-(0)6-63680090, E-mail: [yasu.bmt@kansai-u.ac.jp](mailto:yasu.bmt@kansai-u.ac.jp)

## 血液適合性高分子材料上におけるがん細胞の Blebbing 様現象と生存性の相関

<sup>1</sup>九州大学大学院工学府, <sup>2</sup>九州大学先端物質化学研究所, <sup>3</sup>山形大学有機材料システム  
○関田 将伍<sup>1</sup>, 荒津 史裕<sup>2</sup>, 蔡 孟諭<sup>2</sup>, 柏崎 亜樹<sup>2</sup>, 小林 慎吾<sup>2</sup>, 田中 賢<sup>1,2,3</sup>

【緒言】現在、日本で最も多い死因はがんであり、がんの超初期段階診断や薬剤スクリーニング技術の確立が急務である。X線検査をはじめとする現在のがんの診断法では、超初期段階での確定診断が困難であるため、新たな診断として血中循環がん細胞 (Circulating tumor cells; CTC) が注目されている。CTCは原発巣から血液中に浸潤したがん細胞であり超初期段階においてもその存在が認められるが、数が非常に少ない。CTCの分離手法として、上皮細胞接着分子 (Epithelial cell adhesion molecule; EpCAM) に対する抗体を用いた手法が唯一アメリカ食品医薬品局 (Food and drug administration; FDA) の承認を受けている。しかし、この手法では EpCAM 陽性のがん細胞しか捕捉できないため、EpCAMの発現の有無に関わらずがんの診断に用いるためには、効率的に高純度で多種の CTC を回収でき、生存させることが重要となる<sup>1)</sup>。また、がん細胞は他の組織や臓器へ浸潤する際に Blebbing と呼ばれる細胞膜の突出が関与することが示唆されている<sup>2)</sup>。我々は、Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) が、含水時に中間水と呼ばれる特殊な水和構造を形成し、血球系細胞は接着せず、がん細胞は接着する特徴を示してきた<sup>3-5)</sup>。特に、ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) 非含有の培養条件下で EpCAM 陰性のヒト線維肉腫細胞株 (HT-1080) を PMEA 上で培養した際、Blebbing のような細胞膜の突出 (以後 Blebbing 様現象と表記) が観察され、組織培養ポリスチレン (Tissue culture polystyrene; TCPS) 上での培養と比較して、培養4日目まで高い生存性が確認された。本研究では、中間水を有する PMEA およびその類似体とがん細胞の生存性の相関を解明し、効率的に高純度で多種の CTC を回収し、生存させる技術の確立を目指す。

【実験】中間水量の異なる PMEA、およびその類似体である Poly(butyl acrylate) (PBA)、Poly(3-methoxypropionic acid vinyl ester) (PMePVE)<sup>6)</sup>、および Poly{2-(2-methoxyethoxy) ethyl acrylate (Me2A)-co-n-butyl acrylate (BA)} (PMe2A) をスピンコート法により Polyethylene terephthalate (PET) 基板表面に塗布した。各高分子基板上に EpCAM 陽性のヒト肺腺がん由来細胞株 (A549) と EpCAM 陰性の HT-1080 を FBS 非含有培地中に播種して、1日間培養した後に蛍光免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡にて細胞形態を観察した。また、同様の条件で A549 と HT-1080 を播種して、一方に Blebbing 阻害剤を添加し、4日間培養後に接着細胞数を計測した。

【結果と考察】上記のがん細胞は FBS 非含有条件下において、PMEA および PMePVE 上のみにおいて、Blebbing 様現象が観察され (Fig.1)、4日目において他の高分子基板と比較して多くの細胞数が接着していた。また、Blebbing 阻害剤を添加した場合には、PMEA および PMePVE 上において接着細胞数が有意に減少した。さらに、接着細胞数の多かった PMEA および PMePVE 上では、細胞の凝集が観察された一方、Blebbing 阻害剤を添加した場合には、凝集が見られなくなった。これらの結果から、中間水を有する PMEA および PMePVE 上では Blebbing 様現象が生じ、細胞の凝集および生存性の向上に寄与していると考えられる。

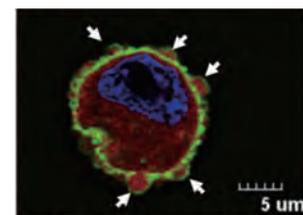


Fig.1 PMEA上におけるHT-1080細胞のBlebbing様現象(培養1時間)  
赤色がvinculin、緑色がF-actin、青色が核。矢印はBlebbing様現象を示す。

【参考文献】1) M. T. Gabriel, *et al.*, *Clinical Chemistry*, 2015, 62:4, 571-581., 2) G. T. Charras, *Journal of Microscopy*, 2008, 231, 466-478., 3) M. Tanaka, *et al.*, 特許第 6278321 号 4) M. Tanaka, *et al.*, *Biomaterials*, 2000, 21, 1471-1481., 5) T. Hoshiba, *et al.*, *Adv. Healthcare Mater*, 2014, 3, 775-784., 6) K.Sato, *et al.*, *Biomacromolecules*, 2017, 18, 1609-1616.

### Correlation between Blebbing-like formation and viability of tumor cells on blood compatible polymers.

Shogo SEKIDA<sup>1</sup>, Fumihiko ARATSU<sup>2</sup>, Meng-Yu TSAI<sup>2</sup>, Aki KASHIWAZAKI<sup>2</sup>, Shingo KOBAYASHI<sup>2</sup>, Masaru TANAKA<sup>1,2,3</sup>, <sup>1</sup>Graduate School of Engineering, <sup>2</sup>Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, <sup>3</sup>Institute of Organic Materials, Yamagata University, <sup>1</sup>Tel/Fax: +81-92-802-6238, E-mail: masaru\_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

## がん細胞のアポトーシスを誘導する細胞膜透過性レドックスリン脂質ポリマーの創製

<sup>1</sup> 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻, <sup>2</sup> 名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻, <sup>3</sup> 大阪大学太陽エネルギー化学研究センター  
 ○金子真大<sup>1</sup>, 石川聖人<sup>2,3</sup>, 石原一彦<sup>1</sup>, 中西周次<sup>3</sup>

【緒言】がん細胞は、酸素存在下においても酸化的リン酸化を利用せずに解糖系を亢進させるワールブルグ効果に知られるように、正常細胞とは異なる代謝様式を有している。近年、この代謝の違いに着目した抗がん剤の研究が行われている。例えば、酸化的リン酸化を促進する化合物や解糖系を阻害する化合物を添加することで、がん細胞に細胞死が誘導されることが報告されている(1)。我々は、代謝が多数の酸化還元反応により構成されることを踏まえ、細胞内から電子を引き抜くことで代謝経路を改変出来れば、がん細胞株に細胞死が誘導されるのではないかと仮説を立てた。ここで、細胞内から電子を引き抜くためには、細胞親和性・細胞膜透過性・酸化還元活性を有した電子メディエータが必要とされる。我々は、これらの条件を満たす電子メディエータとして、両親媒性のレドックスリン脂質ポリマー poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-co-vinyl ferrocene (VFc)] (pMFc) (2,3) を創製してきた(Fig. 1)。pMFc の酸化還元電位 (0.50 V vs. SHE) は、主要な細胞内酸化還元種よりも正であるため、pMFc により細胞内から電子を引き抜くことが可能である。本研究では、pMFc を用いることで、細胞内からの電子引き抜きががん細胞株に与える影響を検討した。

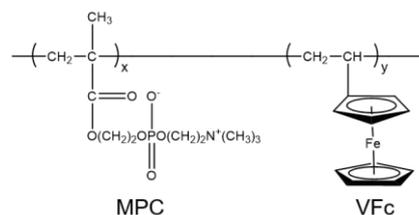


Figure 1 Chemical structure of pMFc.

【実験】pMFc は MPC、VFc をモノマー、2,2'-azobis(isobutyronitrile) を開始剤とするフリーラジカル重合により合成した (Fig. 1)。がん細胞のモデルとして、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞を用いた。MDA-MB-231 細胞に対して、種々の濃度で pMFc を添加し、24 時間後の細胞生存率を Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。

【結果と考察】還元体 pMFc と酸化体 pMFc を MDA-MB-231 細胞に添加し細胞生存率の比較を行った。その結果、電子を受け取ることのできない還元体 pMFc を添加した系では細胞生存率の低下は見られなかった。一方で、酸化体 pMFc を添加した系では、細胞生存率が濃度依存的に低下する傾向が認められた (Fig.2)。これらの結果は細胞死誘導における、電子引き抜きの重要性を示している。最後に pMFc 存在下で培養された細胞に対してアネキシン V アッセイを行ったところ、アポトーシスによって細胞死が誘導されていることが確認された。以上の結果は、pMFc を介した細胞内からの電子引き抜きにより、がん細胞にアポトーシスが誘導されたことを強く示唆している。

本研究は JSPS 科研費 JP17H02097, JP18J14910 の助成を受けたものです。

【参考文献】1) A. Le *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2009**, 107, 2037. 2) K. Nishio *et al.*, *ChemPhysChem*, **2013**, 14, 2159. 3) M. Kaneko *et al.*, *Bioelectrochemistry*, **2017**, 114, 8.

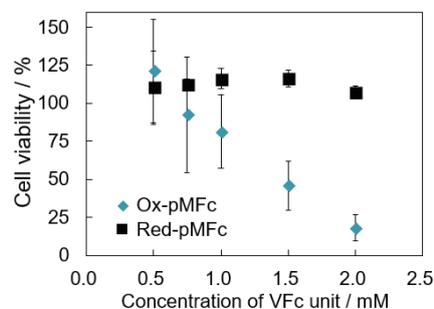


Figure 2 Cell viability of MDA-MB-231 cells after the addition of pMFc.

### Creation of cell membrane permeable redox phospholipid polymers toward induction of apoptosis in cancer cells

Masahiro Kaenko<sup>1</sup>, Masahito Ishikawa<sup>2,3</sup>, Kazuhiko Ishihara<sup>1</sup>, Shuji Nakanishi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, <sup>2</sup>Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, <sup>3</sup>Nagoya University, Research Center for Solar Energy Chemistry, Osaka University

Tel: +81-3-5843-7128, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: [kaenko@mpc.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:kaenko@mpc.t.u-tokyo.ac.jp)

## 骨転移がん治療を目指した骨指向性リン脂質ポリマー

<sup>1</sup>関西大学 ORDIST, <sup>2</sup>関西大学化学生命工学部, <sup>3</sup>松本歯科大学歯学部  
○大高 晋之<sup>1</sup>, 山口 知己<sup>2</sup>, 平賀 徹<sup>3</sup>, 岩崎 泰彦<sup>1,2</sup>

【緒言】 我が国の乳がん、前立腺がん、肺がんの患者数は 29 万人におよび、これらのがんは 75%と極めて高い頻度で骨転移する。骨転移を起こすと、患者の QOL 低下や予後不良を招くことが知られているが、未だ骨転移に対する根本的な治療法は存在しない。我々は、骨指向性の薬剤輸送システムを構築することで、転移巣である骨に効率的に抗がん剤を送達し、骨転移がんを消去する治療薬の創出を目指している。Konno らは、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) とメタクリル酸ブチル (BMA) のコポリマーと疎水性抗がん剤を共に溶かすことで、ナノサイズのポリマーミセルを形成し疎水性抗がん剤を可溶化できることを報告した<sup>1</sup>。本研究では、複合体の骨転移巣への効率的な送達を目的として、ポリマー側鎖にアレンドロネートを導入すること複合体への骨指向性の付与を試みた。発表では、本複合体の物性評価、ヒト乳がん細胞に対する抗がん作用評価、*in vivo* 骨指向性の評価について報告する。また、骨転移マウスに対する本複合体の抗がん作用評価の取り組みについても併せて報告する。

【実験】 既報に従って *N*-メタクリル酸アレンドロネート (NMA) を合成した<sup>2</sup>。ラジカル重合により MPC, BMA, NMA およびローダミン標識メタクリルモノマー (M-Rho) を用いてポリマーを合成した。ポリマー溶液 (50 mg/mL) にドセタキセル (DTX) を 0.80 mg 添加し、2 時間超音波処理して複合体を形成した。動的光散乱法およびレーザー Doppler 法を用いて、複合体の粒径とゼータ電位を測定した。マウス線維芽細胞株 (L929)、マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7)、ヒト乳がん細胞株 (MDA-MB-231, MCF7) を、ポリマー単体および複合体を添加した培地で 2 日間培養し細胞毒性と抗がん作用を評価した。複合体を BALB/c マウスの尾静脈より投与し、投与 24 時間後の複合体の分布を *in vivo* イメージャーと共焦点顕微鏡で評価した。

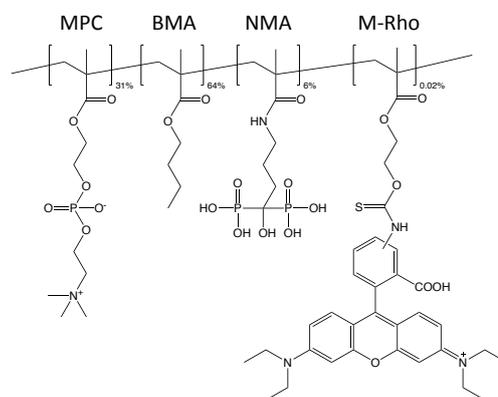


Figure 1: Structure of bone targeting polymer

【結果と考察】 50 mg/mL の溶液中に  $2.9 \pm 1.0$  mg/mL の DTX が可溶化できた。PBS 中における複合体の粒径は 33.7 nm であった。また、アレンドロネート側鎖の導入により複合体のゼータ電位は  $-1.8 \pm 1.0$  から  $-11.8 \pm 1.6$  mV に減少したことから、複合体表面にアニオン性のアレンドロネートが導入されたことがわかった。臨床で用いられるドセタキセル最大投与量の可溶化を想定して、終濃度 1.25 mg/mL のポリマー添加条件下で L929 と RAW264 を 2 日間培養したところ、いずれの細胞でも毒性も見られなかった。ヒト乳がん細胞に対する複合体の抗がん作用を評価したところ、IC50 が DTX 濃度換算で 0.1-1 nM であった。DTX のみをエタノールで培地に添加した場合の IC50 も同程度であったことから、複合体を形成している状態であっても DTX の抗がん作用は阻害されないことがわかった。またアレンドロネートを導入したポリマーをマウス血中に投与したところ、導入前と比較してより多くのポリマーが骨表面に集積した。以上の結果より、本ポリマーを用いて複合体を形成することで抗がん作用と骨指向性の両立が実現されたことから、骨転移がんに対する新たな薬物治療法への応用が期待される。

【謝辞】本研究は科研費 16H03185 および KU-SMART (Kansai University Smart Materials for Advanced and Reliable Therapeutics) プロジェクトの助成を受けて実施された。【参考文献】<sup>1</sup>T. Konno, et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*. **2003**; 65: 209-214. <sup>2</sup>S. K. Khelfallah, et al. *Org. Biomol. Chem.* **2015**; 13: 11382-11392.

#### Bone-targeting phospholipid polymer as chemotherapy for bone metastasis

Akihisa Otaka<sup>1</sup>, Tomoki Yamaguchi<sup>2</sup>, Toru Hiraga<sup>3</sup>, Yasuhiko Iwasaki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ORDIST, Kansai University <sup>2</sup>Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University.

<sup>3</sup>Department of Histology and Cell Biology, Matsumoto Dental University.

Tel: +81-6-6368-1121 (ext. 5742), Fax: +81-6-6368-0090, E-mail: yasu.bmt@kansai-u.ac.jp

## ディッシュ型金属製細胞培養容器を用いた MCF-7 細胞の培養

<sup>1</sup>慶應義塾大学理工学部機械工学科, <sup>2</sup>慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻,  
<sup>3</sup>東京工業大学物質理工学院材料系  
 ○竹下 遙<sup>1</sup>, 井田 雄太<sup>2</sup>, 倉科 佑太<sup>3</sup>, 宮田 昌悟<sup>1</sup>, 竹村 研治郎<sup>1</sup>, 小茂鳥 潤<sup>1</sup>

【緒言】 がんの治療法の一つとして、がん細胞に対して熱刺激の付与を行う温熱療法がある。これは、がん細胞と正常細胞の温度に対する反応に差があるという特徴を利用したものである。この効果を検証するために基礎的な研究が行われているが、これらの研究における熱刺激の付与は雰囲気制御で行われているため、細胞が直接受けた熱刺激の詳細は不明である。培養器を熱伝導率の高い金属で作製することで、熱刺激を細胞に直接付与することが可能と考えられる。著者らはこれまでに、培養面が金属で構成された培養器を作製し、熱刺激や超音波振動刺激などを細胞に付与する研究を行ってきた。その結果、細胞と直接接触する培養面が金属であっても、細胞培養が可能であることを報告している。しかしながら、これまでの培養器は、培養面のみを金属としていたため、与えようとする物理的刺激に応じて、培養器の形状を変化させる必要があった。したがって多方面の研究に適用可能な培養器を作製することが極めて重要である。そこで本研究では、その第一段階として、Ti-6Al-4V ELI 合金を用いてディッシュ型金属製細胞培養容器を作製し、それにより、通常通りの細胞培養が可能か否かについて検討を行った。なおこの培養器は、超音波振動刺激、熱刺激、電気刺激などの物理的刺激を直接細胞に与えることができる。

【実験】 Figure 1(A)に Ti-6Al-4V ELI 合金を用いて作製したディッシュ型金属製細胞培養容器（内径 35 mm, 高さ 14 mm）の概観を示す。Figure 1(B)は培養面の SEM 写真である。同図から明らか通り、旋盤による加工の痕跡が残存している。そこで本研究では、ディッシュ型金属製細胞培養容器の培養面を研磨紙(#300, #600)で研磨した後、微粒子ピーニング (FPP: Fine Particle Peening) 処理を施し、培養面の凹凸を均一化した。FPP 処理後、アセトンを用いて超音波洗浄を行い、オートクレーブ滅菌を行った。培養面となる基材表面はレーザー顕微鏡で観察し、表面粗さを測定した。この培養器を用いて、 $4.8 \times 10^5$  個の MCF-7 (ヒト乳がん由来) 細胞をディッシュ型金属製細胞培養容器と通常のディッシュに播種した。2日間培養した後、細胞の増殖性の評価を行った。増殖性の評価には血球計算盤を用いた。

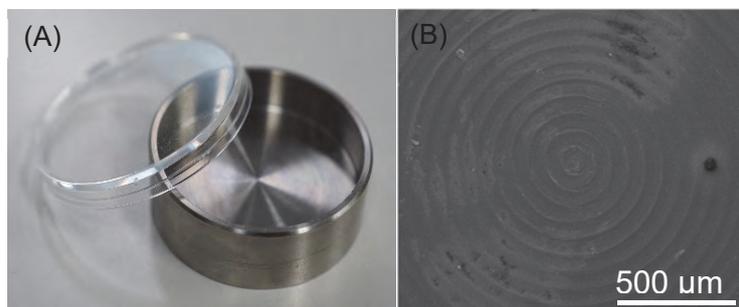


Figure 1 (A) Metallic dish (i.d.=35mm, height=14 mm),  
 (B) SEM image of surface

【結果と考察】 作製したディッシュ型金属製細胞培養容器の培養面に残存していた加工痕は、研磨と FPP 処理を施すことにより除去が可能であり、ほぼ均等の粗さを有する培養面が作製できることが明らかとなった。この培養器を用いて、MCF-7 細胞を培養した結果、通常のディッシュとほぼ同程度の生細胞数が確認された。なお、培養実験後に再度 FPP 処理を施した培養器を用いた場合にも、ほぼ、同程度の増殖性を有することが確認された。このことは、金属製細胞培養容器が、物理的刺激を付与するのみならず、再利用可能なことを示すものである。

### Culture of MCF-7 human breast cancer with metallic dish

Haruka TAKESHITA<sup>1</sup>, Yuta IDA<sup>2</sup>, Yuta KURASHINA<sup>3</sup>, Shogo MIYATA<sup>1</sup>, Kenjiro TAKEMURA<sup>1</sup>, Jun KOMOTORI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University <sup>2</sup> Graduate School of Science and Technology, Keio University <sup>3</sup>Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

Tel: +81-45-566-1502, Fax: +81-45-566-1502, E-mail: o-ji.lopear\_abyss@keio.jp

## 水酸化ナトリウム水溶液処理が多孔質チタニア微小球の構造と物性に及ぼす影響

<sup>1</sup>東北大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>東北大学大学院医工学研究科

○半田 祥真<sup>1</sup>, 川下 将一<sup>2</sup>

【緒言】肝臓がん治療低侵襲機能温存療法の一つに、肝動脈化学塞栓療法がある。同法では、抗がん剤を表面に吸着させた微小球によって腫瘍近位の毛細血管を塞栓し、がん細胞への栄養補給を断つと同時に、塞栓先の狭い範囲にのみ抗がん剤を徐放して治療を行う。これまでに我々は、シリカナノ粒子 (SNP) を含むチタニア (TiO<sub>2</sub>) 微小球を 3 M、20°C の水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH aq.) で 24 時間処理すれば、多孔質 TiO<sub>2</sub> 微小球が得られ、同微小球が毛細血管の直径と等しい 20 μm 程度の粒径を持ち、優れたドキソルビシン (DOX) 吸着・徐放能を持つことを明らかにした。しかし、NaOH aq. 処理後も SNP の一部が微小球内に残存し、それが細胞毒性を引き起こす懸念があった。そこで本研究では、SNP の溶解に用いる NaOH aq. の濃度と温度を変化させ、NaOH aq. 処理が多孔質 TiO<sub>2</sub> 微小球の構造と物性に及ぼす影響を調べた。

【実験】油相として、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノステアレート、1-ブタノール、ケロシンの順にビーカーに加え攪拌した。また水相として、メタノール、チタンテトラプロポキシド、ジエタノールアミンの順にビーカーに加え攪拌した。さらに粒径 50 nm の SNP 混濁液を水相に加え、全体を油相に少しずつ加え攪拌した。上澄み液を取り除いて試料表面を洗浄し、乾燥させた後に 150°C で 13 時間および 600°C で 8 時間加熱処理することで SNP 含有 TiO<sub>2</sub> 微小球を得た。SNP 含有微小球を 1 M、4 M あるいは 7 M の NaOH aq. に浸漬し、50°C あるいは 80°C で 24 時間振とうさせた。その後、上澄み溶液を取り除いて試料表面を洗浄し、乾燥させることで多孔質 TiO<sub>2</sub> 微小球を得た。走査型電子顕微鏡

(SEM) およびフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) を用いて、得られたサンプルの構造解析を行った。さらに、DOX 水溶液に微小球を浸漬し、36.5°C で 5 時間回転浸漬させることで DOX 吸着試験を行い、その後リン酸緩衝生理食塩水に DOX 吸着微小球を浸漬し、36.5°C で 1 週間回転浸漬させることで DOX 徐放試験を行った。

【結果と考察】SEM 観察によれば、いずれの NaOH aq. 処理条件においても微小球は崩壊せず、処理前と同じ粒径 20 μm 程度の球形を保っていた。また、その表面は、出発溶液に添加した SNP の粒径と同じ約 50 nm の細孔構造を有していた。これより、NaOH aq. 処理により SNP 含有 TiO<sub>2</sub> 微小球から SNP が溶出し、微小球が多孔質化したと考えられる。また、FT-IR 測定によれば、50°C の 1 M NaOH aq. 処理後にも Si-O に帰属される吸収バンドがわずかに見られたが、これは TiO<sub>2</sub> 微小球のマトリックス中に閉じ込められた SNP によるものと考えられ、そのような SNP が生体内で微小球から溶出する可能性は極めて低いと推察される。また、DOX 吸着・徐放試験によると、50°C の 1 M NaOH aq. 処理により得られた多孔質 TiO<sub>2</sub> 微小球は、1 mg あたり最大 9.9 μg の DOX を吸着し、7.8 μg の DOX を 1 週間以内に徐放した (徐放率 約 79%)。以上より、本研究により得られた多孔質 TiO<sub>2</sub> 微小球は、肝動脈化学塞栓療法に有用であると期待される。

---

### Effect of NaOH aqueous solution treatment on structure and properties of porous titania microspheres

Shoma Handa<sup>1</sup>, Masakazu Kawashita<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Tohoku University, <sup>2</sup>Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University

Tel: 022-795-4735, Fax: 022-795-4735, E-mail: shoma.handa.q1@dc.tohoku.ac.jp

## 2E-13

## 白血病細胞結合ペプチドの高密度固定化表面による高効率細胞捕捉

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>群馬県立小児医療センター  
○吉原 彬文<sup>1</sup>, 東 倫之<sup>1</sup>, 山田 佳之<sup>2</sup>, 高井 まどか<sup>1</sup>

## 【緒言】

近年、急性白血病の治療は、強力な化学療法の進歩により予後が大幅に向上した。しかしながら、化学療法は治療後の副次的障害を引き起こす危険性があり、特に小児の急性白血病の2~3割は依然として予後不良が見られる。更には、主流となっている血液の微小残存病変（Minimal residual disease, MRD）による再発リスク診断は偽陰性率が高いため、より正確な診断が求められている。我々は、抗体とコラゲナーゼ認識ペプチドを用いて、極微量の血中循環がん細胞を選択性良く捕捉した後、生きた状態で細胞を剥離するシステムを開発した<sup>[1]</sup>。そこでこの細胞分離回収の原理を基に、血中のMRDを捕捉することで白血病の再発リスク診断を行うシステムを確立することを本研究の目的とした。今回は、白血病細胞結合ペプチドを高密度に固定化した表面を作製し、細胞捕捉の高効率化を図った。

## 【実験】

ペプチドの高密度固定化表面として、第一級アミンと結合する Poly(styrene-co-maleic anhydride) (PSMA)を合成した。白血病細胞の捕捉には、白血病細胞と選択的に結合することが報告されている配列を含むペプチド (GGGPLDIDYF, PLD)<sup>[2]</sup>を合成して用いた。我々の系においても、ポリエチレングリコール架橋剤を介してペプチドを固定化した表面において PLD 配列の選択性を確認している。N 末端アミノ基を介して PSMA に固定化し、その量を水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) にて評価した。また、白血病細胞モデルとして CCRF-CEM 細胞を用い、選択的な細胞捕捉および捕捉効率を評価した。

## 【結果と考察】

PSMA をコーティングした基板に PLD ペプチド溶液を作用させたときの QCM の結果から、PSMA 表面に対するペプチド固定化量は、 $143 \pm 26 \text{ ng/cm}^2$  と計算でき、PSMA 表面に約  $0.8 / \text{nm}^2$  の密度でペプチドが固定化されていることが分かった。これは、ポリスチレンに対するアフィニティタグ配列の吸着量よりも大きな値であり<sup>[1]</sup>、PSMA を用いることによる固定化密度の向上が確認できた。また、PLD ペプチド固定化 PSMA 基板を用いた細胞捕捉実験の結果を Fig. 1 に示す。PLD ペプチドを固定化しなかった PSMA 基板に対し、PLD ペプチド固定化基板では細胞の接着が多く見られたことから、固定化したペプチドにより細胞を捕捉できることが分かった。以上の結果から、ペプチド固定化 PSMA 表面を用いることによる細胞捕捉率の向上が期待できる。

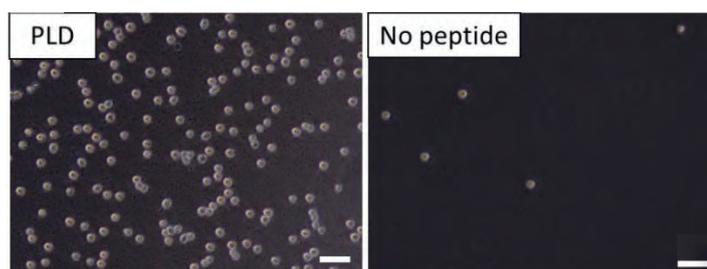


Fig. 1. CCRF-CEM cells adhered on PLD peptide-immobilized (left) and no peptide-immobilized (right) PSMA-coated surface. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .

## 【参考文献】

- [1] A. Yoshihara, *et al.*, *Acta Biomater.* **2018**, 67, 32-41.  
[2] S. Jäger, *et al.*, *Leukemia* **2007**, 21, 411-420

---

**Highly efficient cell capturing surface of high density-immobilized leukemia-binding peptide**

Akifumi Yoshihara<sup>1</sup>, Tomoyuki Azuma<sup>1</sup>, Yoshiyuki Yamada<sup>2</sup>, Madoka Takai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Gunma Children's Medical Center

Tel: +81-03-5841-2959, Fax: +81-03-5841-0621, E-mail: [yoshihara@bis.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:yoshihara@bis.t.u-tokyo.ac.jp)

## アレルギー特異的な免疫治療を目指したビタミン-ペプチド コンジュゲートの創製

<sup>1</sup>九州大学大学院工学研究院, <sup>1,2</sup>九州大学未来科学創造センター, <sup>3</sup>九州大学分子システム科学センター, <sup>4</sup>九州大学先端医療イノベーションセンター

○ 杠 和樹<sup>1</sup>, 吉田 綾香<sup>1</sup>, 岸村 顕広<sup>1,3</sup>, 森 健<sup>1,2</sup>, 片山 佳樹<sup>1,2,3,4</sup>

### 【緒言】

アレルギー疾患は、世界人口の20%が罹患している国際的な健康問題である。本疾患を根治する唯一の治療法は、アレルギー特異的な免疫療法である。本治療法は患者にアレルギーエキスを投与することで、アレルギー特異的な免疫寛容を誘導し、症状を和らげることができる。しかしながら、長期間かつ継続的な治療が必要であることや重篤な副作用であるアナフィラキシーショックが引き起こされるなど、患者への負担やリスクが大きい。そこで私たちは、ビタミンと抗原ペプチドをコンジュゲートさせた分子を考案した。具体的には、ビタミンにより樹状細胞を未成熟の状態に保ち、未分化の T 細胞に抗原ペプチドを提示させることで、抗原特異的な制御性 T 細胞の分化を誘導する(Figure.1)。

ビタミン-ペプチドコンジュゲートによる効果的な抗原特異的な制御性 T 細胞の分化を誘導は、治療期間の短縮および副作用の軽減が期待される。

### 【実験】

抗原ペプチドは Fmoc 固相合成法により合成し、ビタミンの修飾位置を N 末端に制御するためにリジン側鎖を Fmoc 化した。ビタミン (ビタミン A、ビタミン D3) を NHS 化し、液相中でペプチドと反応させた後に、脱 Fmoc 化を行い、ビタミン-ペプチドコンジュゲートを合成した。高速液体クロマトグラフ (HPLC) により精製を行った。In vitro での評価は、DC2.4 (マウス骨髄由来樹状細胞) を用いた。DC2.4 にビタミン-ペプチドコンジュゲートを添加し、サイトカインの産生及び抗原の提示を評価した。

### 【結果と考察】

ビタミン-ペプチドコンジュゲートは、質量分析 (MALDI-TOF MS) により合成が成功したことを確認した。また HPLC 精製後、未結合のビタミンが除かれたことを ESI-MS により確認した。当日は、ビタミン-ペプチドコンジュゲートを添加した DC2.4 のサイトカイン産生および抗原の提示を示したデータを報告する予定である。

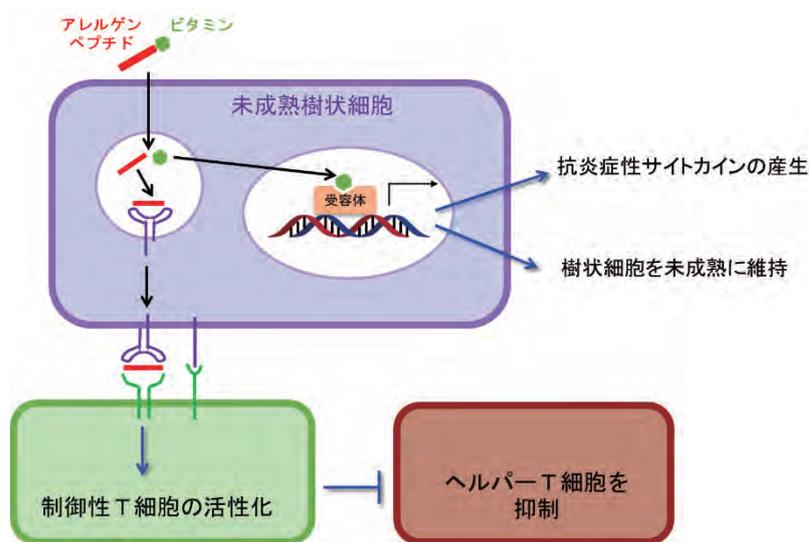


Fig.1 ビタミン-ペプチドコンジュゲートの作用機序

### Development of vitamin-peptide conjugate for allergen-specific immunotherapy

Kazuki Yuzuriha<sup>1</sup>, Ayaka Yoshida<sup>1</sup>, Akihiro Kishimura<sup>1,3</sup>, Takeshi Mori<sup>1,2</sup>, Yoshiki Katayama<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University, <sup>2</sup>The Center for Future Chemistry, Kyushu University, <sup>3</sup>International Research Center for Molecular System, Kyushu University, <sup>4</sup>Center for Advanced Medical Innovation, Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan, Tel: +81-92-802-2850, Fax: +81-92-802-2850 E-mail: [k.yuzuriha@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp](mailto:k.yuzuriha@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp)

## 抗原修飾ヒアルロン酸の細胞取り込み及び抗原提示能の評価

<sup>1</sup>北九大院工

○森高 敦<sup>1</sup>, 櫻井 和朗<sup>1</sup>, 望月 慎一<sup>1</sup>

### 【緒言】

近年、三大がん治療に次ぐ、新規がん治療として、がん免疫療法が注目されている。がん免疫療法とは、人々の身体に本来備わっている免疫力を活かした治療法であり、副作用が少なく、従来の治療法と組み合わせて行うこともできることから大いに期待されている。がん免疫療法において、がん細胞を攻撃する細胞は、細胞障害性T細胞 (CTL) として知られていて、このCTLはがん細胞表面上にある抗原ペプチドを目印として攻撃を行う。しかし、抗原ペプチドはその細胞が体にとって異物かどうか知らせるために発現するもので、元々自己の細胞が変異したがん細胞では、抗原性が弱いことで知られている。そこで、外来から非自己の抗原タンパク質を送達することができれば、CTLががん細胞を認識しやすくなり、免疫効果の向上が期待できる。

本研究は、がん細胞に外来の抗原を送達するために、がん細胞特異的キャリアを用いた抗原送達システムの開発を目指している。がん細胞表面上には、CD44 というヒアルロン酸を認識する受容体が過剰に発現しているため、我々はキャリアとして、ヒアルロン酸を選択した。よって、ヒアルロン酸に、抗原タンパク質を化学修飾させ、細胞取り込みを誘導し、複合体の抗原提示能を評価することを目的とする。

### 【実験】

#### 抗原修飾ヒアルロン酸の作製

ヒアルロン酸のグルクロン酸部位にはカルボン酸がある。このカルボン酸を利用し、抗原タンパクであるオボアルブミン (OVA) を修飾させることを試みた。この反応は、HA がもつ、カルボン酸部位に縮合剤である EDC が反応し、さらに、NHS を添加することで脱水縮合反応を促進させ、カルボン酸が活性化した状態で OVA のもつアミノ基と特異的な反応をする。よって、今回は、MES 中で HA に、EDC、NHS を仕込み、氷中でしばらく静置したのち、OVA を加え一晩攪拌した。反応の進行はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により評価した。

### 【結果と考察】

UV のクロマトグラムから OVA と HA の反応の進行を評価した (Figure1)。HA に UV の吸収はなく、OVA には 280 nm の吸収があることから、OVA の溶出時間の変化から反応を判断できる。18 分に現れているピークが OVA のみを流した時のピークで、HA と反応させるとそのピークが 14 分頃に移動していることがわかった。これより、OVA に HA が結合することで分子量が増大し、溶出時間が早まったと考えられる。

また、HA と OVA の反応溶液には未反応の OVA が検出されないことから、ほぼ全ての OVA が HA と結合していると考えられる。屈折率と光散乱の結果から算出した HA/OVA の混合物と HA 単体、OVA 単体の分子量は順に  $1.4 \times 10^6$ 、 $7.5 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^4$  であった。分子量と HA と OVA の仕込み比より HA 1 分子当たり 12 分子の OVA が、結合していると考えられる。

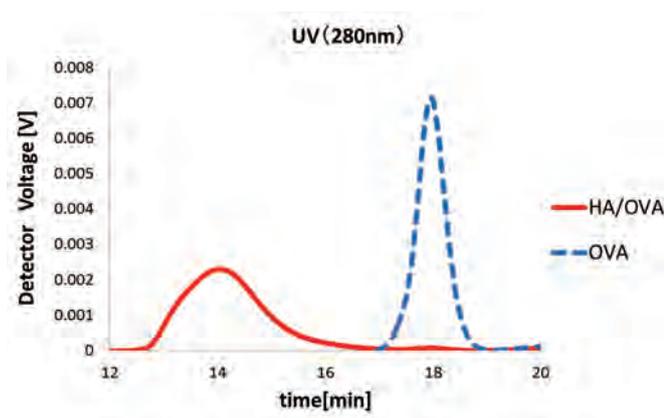


Figure1. Results of GPC(UV)

### Evaluation of cellular uptake and antigen presenting ability of antigen-modified hyaluronic acid

Atsushi Moritaka, Kazuo Sakurai, Shinichi Mochizuki (Department of Chemistry and Biochemistry, the University of Kitakyushu, 1-1 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu, Fukuoka 808-0135, Japan)

Tel: +81-93-695-3298, Fax: +81-93-695-3390, E-mail: y7mab013@eng.kitakyu-u.ac.jp

## エクソソームインプリント材料によるがん細胞由来インタクトエクソソーム認識

<sup>1</sup>神戸大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>安田女子大学薬学部

○竹内 俊文<sup>1</sup>, 森 貴翔<sup>1</sup>, 高野 恵里<sup>1</sup>, 砂山 博文<sup>1,2</sup>, 北山 雄己哉<sup>1</sup>

【緒言】エクソソームは、さまざまな細胞内から、エンドソームに由来して細胞外に放出される脂質二重膜を有する細胞外小胞である。最近、エクソソーム内部に放出された細胞に由来するmiRNAが含まれることが発見され [1]、エクソソームが細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。それ以降、エクソソーム関連研究は爆発的に進展しており、直近では、エクソソーム表面のインテグリンファミリーが、がん転移の臓器指向性に資することが報告され [2]、ますますエクソソーム関連研究の重要性が高まっている。

がんの臓器指向性やがん転移、がんの悪性化に関わるエクソソームの解析は、がんを診断する極めて重要なツールになることが予想される。しかしながら、現状のエクソソーム分析は、超遠心やアフィニティー分離などを併用して行われるため、簡便で迅速とはいえない。煩雑な前処理をすることなしに、がん細胞から放出されるエクソソームと正常細胞由来エクソソームを識別することができれば、生検に代わるがん診断のための新たなリキッドバイオプシー技術となることが期待される。本研究では、標的エクソソームを迅速・簡便に識別できるエクソソームセンシングシステムを開発し、がん診断のためのリキッドバイオプシーに適用可能かどうか検討した。

【実験】エクソソームセンシング材料は、分子インプリンティング技術 [3]とポストインプリンティング蛍光修飾技術[4-6]を用いて、エクソソーム表層の膜タンパク質を認識する抗体を分子認識素子に用いて調製した。

【結果と考察】得られたエクソソームセンシング材料に対するエクソソームの吸着等温線を作成し、見かけの結合定数を算出したところ、 $10^{16} \text{M}^{-1}$  オーダーと見積もられ、検出試薬などを添加することなしに、高感度でインタクトエクソソームの蛍光センシングが可能であることがわかった。また、希釈血清中でも緩衝液中と同様の応答を示した。さらに、複数の膜タンパク質の検出パターンから、健常人由来エクソソームとがん細胞由来エクソソームの識別が可能であったことから、本法は、生検に代わる簡便で迅速なリキッドバイオプシー手法として期待される。

### 【参考文献】

- [1] Valadi, H. et al., *Nat. Cell Biol.* 2007, 9, 654.
- [2] Hoshino, A. et al., *Nature* 2015, 527, 329-335.
- [3] Takeuchi, T. et al., *Chromatography* 2014, 35, 139-145 (Open access).
- [4] Horikawa, R. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 13023.
- [5] Takeuchi, T. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 12765.
- [6] Takeuchi, T. et al. *Chem. Commun.*, 54, 6243-6251 (Feature article).

---

### Exosome-imprinted thin films for recognizing intact exosomes derived from cancer cells

Kisho MORI<sup>1</sup>, Eri TAKENO<sup>1</sup>, Hirobumi SUNAYAMA<sup>1,2</sup>, Yukiya KITAYAMA<sup>1</sup>, Toshifumi TAKEUCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering, Kobe University

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, Yasuda Women's University

Tel: +81-78-803-6158, Fax: +81-78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

## 炎症環境の改善を目指した アポトーシス細胞膜模倣型ポリマーと抗炎症評価

<sup>1</sup>東京理科大学大学院 基礎工学研究科, <sup>2</sup>物質・材料研究機構 (NIMS) 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA), <sup>3</sup>筑波大学大学院 数理工学物質科学研究科  
○矢野宥人<sup>1,2</sup>, 中川泰宏<sup>2,3</sup>, 菊池明彦<sup>1</sup>, 荏原充宏<sup>1,2,3</sup>

【緒言】近年、アポトーシス細胞によるマクロファージの抗炎症性サイトカイン産生誘導や活性酸素の生産抑制など、能動的な抗炎症機能が報告されている。この抗炎症機能の主なメカニズムとしては、アポトーシス細胞が提示するホスファチジルセリン (PtdSer) に起因することが明らかとなっている。しかしながらアポトーシス細胞を患者に投与する場合、安全性の担保や運用コスト、汎用性等の問題点が挙げられる。そこで、細胞を用いない治療法の確立のため、アポトーシス細胞膜を模倣した抗炎症作用を有する高分子材料の開発を試みることを本研究の目的とした (Fig. 1)。本発表では、PtdSer の抗炎症活性部位であるホスホリルセリン (PS)基を有するメタクリル系モノマー、ポリマー (poly(MPS))の合成及びミクログリアを用いた抗炎症活性評価を行った。

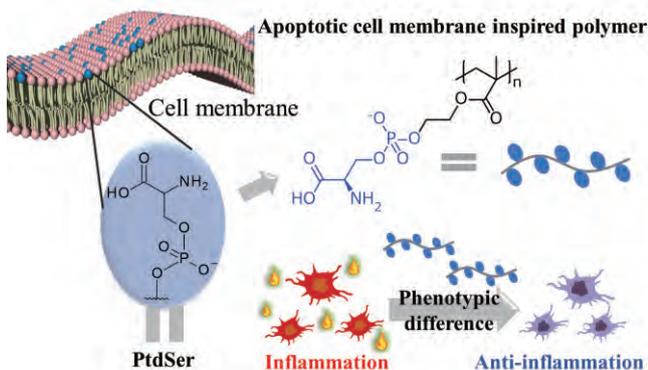


Fig. 1 Schematic illustration of therapeutic effect of apoptotic cell membrane inspired polymer, poly(MPS).

本発表では、PtdSer の抗炎症活性部位であるホスホリルセリン (PS)基を有するメタクリル系モノマー、ポリマー (poly(MPS))の合成及びミクログリアを用いた抗炎症活性評価を行った。

【実験】 *N*-Boc-L-serine *tert*-butyl ester, *tert*-butyl tetraisopropylphosphorodiamidite, imidazole hydrochloride を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  に溶解させ攪拌した。2-hydroxyethyl methacrylate, imidazole hydrochloride を加え、攪拌、精製し *t*-Bu/Boc-MPS モノマーを得た。*t*-Bu/Boc-MPS モノマーを DMF に溶解し、2,2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)を *t*-Bu/Boc-MPS モノマーに対して 1 mol%加え、36°C で重合を行った。透析により得られた白色粉末を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中に再溶解し、*tert*-butyl hydroperoxide, trifluoroacetic acid を用いて酸化、脱保護を行い、poly(MPS)を作製した。次に、ミクログリア細胞株 (MG-6)を細胞培養液中で培養後、poly(MPS)を添加し、静置した。その後炎症性刺激(リポ多糖類 (LPS) )を添加し、ELISA によって炎症性サイトカインである IL-6 の産生量を定量した。

【結果と考察】重合反応後に得られた白色固体を  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定したところ、5.5-6.0 ppm に存在していたビニル由来のピークが消失し、重合が進行したことを確認した。さらに酸化、脱保護後、得られた白色固体を  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定し、1.5 ppm に存在していた *N*-Boc-L-serine *tert*-butyl ester 由来の *t*-Bu 基のピークの消失を確認した。以上の結果より poly(MPS)の合成を確認した。続いて MG-6 培養系に LPS を 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で添加した際、炎症性サイトカインである IL-6 が有意 (920 pg/mL)に産生された (Fig. 2)。一方、MG-6 培養系に poly(MPS) (5.0 mmol/L)を添加した群では、LPS による IL-6 の産生は有意に抑制され、本実験系では IL-6 の検出限界以下であった。以上より、poly(MPS)が有効な抗炎症活性を発現可能な材料として期待できる。

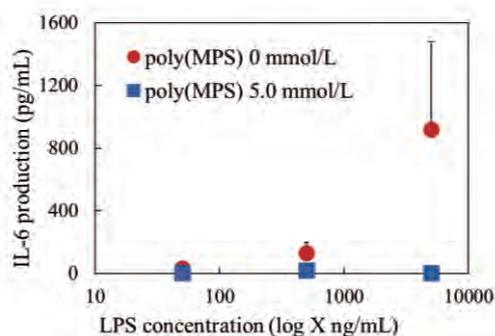


Fig. 2 Suppression of IL-6 production from microglia cells by poly(MPS).

**Apoptotic cell membrane inspired polymers towards the improvement of inflammatory environment.** Yuto YANO<sup>1,2</sup>, Yasuhiro NAKAGAWA<sup>2,3,4</sup>, Akihiko KIKUCHI<sup>1</sup>, and Mitsuhiro EBARA<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., <sup>2</sup>Internat'l Center for Mater. Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science, <sup>3</sup> Grad. Sch. of Pure and Appl. Sci., Univ. of Tsukuba  
Tel: +8129-851-3354, Fax: +81-29-860-4708, E-mail: EBARA.Mitsuhiro@nims.go.jp

## 放射線・温熱治療用イットリウム・ホルミウム含有ガーネット型フェライトの作製

<sup>1</sup>東北大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>東北大学大学院医工学研究科  
○松本 晋太郎<sup>1</sup>, 小川 智之<sup>1</sup>, 川下 将一<sup>2</sup>

【緒言】主ながん治療法としては、外科的療法、放射線療法、化学療法があるが、従来の治療法はいずれも患者の身体に負担をかけるため、より低侵襲な治療法の開発が求められている。そのような低侵襲治療法として、放射性微小球による血管内放射線療法や磁性微小球による血管内温熱療法が提案されている。イットリウム (Y) やホルミウム (Ho) を含んだ微小球に熱中性子線を照射すると、同微小球はβ線を放射するようになる。放射性 Y および放射性 Ho のβ線の飛程および半減期はそれぞれ、約 11 mm および約 9 mm、約 64 時間および約 27 時間と短いため、局所的な放射線治療が可能となる。また、フェライトなどの磁性体を含む微小球は交流磁場下で発熱するため、局所的な温熱治療効果を期待できる。そこで本研究では、放射化可能な元素を含んだ磁性体である、イットリウム鉄ガーネット ( $Y_3Fe_5O_{12}$ )、および  $Y_3Fe_5O_{12}$  の Y の一部を Ho で一部置換した  $Y_{3-x}Ho_xFe_5O_{12}$  を作製し、それぞれの交流磁場下での発熱能、および (Y+Ho) /Fe 比を見積もった。

【実験】硝酸イットリウム n 水和物 4.6076 g、硝酸鉄 (Ⅲ) 9 水和物 8.08 g を超純水 200 ml に溶解させ、これを出発溶液とした。これを 6 M 水酸化ナトリウム水溶液 140 ml に加えて攪拌した。その後、溶液を遠心分離して得られた前駆体沈殿を洗浄、乾燥させた。乾燥後、1400 °C で 1 時間加熱処理を行い、粉碎処理を行うことにより、試料を得た (試料名: Fe-Y)。また、硝酸イットリウム n 水和物 3.0718 g、硝酸ホルミウム n 水和物 1.7504 g、硝酸鉄 (Ⅲ) 9 水和物 8.08 g を超純水 200 ml に溶解させた出発溶液を用意し、同様の合成プロセスを経て試料を得た (試料名: Fe-Y-Ho)。各試料の飽和磁化および保磁力を振動試料型磁力計により測定し、磁場強度 300 Oe での磁気ヒステリシスループの面積から、100 kHz、300 Oe の交流磁場下での発熱量を見積もった。また、各試料の (Y+Ho) /Fe 比は、電子プローブマイクロアナライザの分析結果から見積もった。

【結果と考察】Fe-Y および Fe-Y-Ho の飽和磁化はそれぞれ 4.1 emu/g および 5.4 emu/g、保磁力はそれぞれ 79.6 Oe および 25.4 Oe となった。ボーア磁子  $\mu_B$  を用いると、 $Y^{3+}$  および  $Ho^{3+}$  1 個の磁気モーメントはそれぞれ  $0 \mu_B$  および  $10 \mu_B$  と表されるため、 $Ho^{3+}$  を含む Fe-Y-Ho の飽和磁化が Fe-Y のそれよりも大きくなったと考えられる。図 1 に 300 Oe における各試料の磁気ヒステリシスループを示す。これより、Fe-Y および Fe-Y-Ho の発熱量は、それぞれ 7.1 W/g および 20.4 W/g と見積もられた。Fe-Y-Ho は Fe-Y より飽和磁化が大きいため、ループの面積が大きくなり、発熱能が高くなったと考えられる。また、Fe-Y-Ho の (Y+Ho) /Fe 比は、3.02/5 となった。 $Y_3Fe_5O_{12}$  の Y/Fe 比は 3/5 であるので、Fe-Y-Ho は  $Y_3Fe_5O_{12}$  の Y と同程度の Y および Ho を含み、熱中性子線の照射により  $Y_3Fe_5O_{12}$  と同等の放射能を持つと考えられる。以上より、 $Y_{3-x}Ho_xFe_5O_{12}$  は良好な発熱能と放射能を併せ持ち、がんの放射線・温熱治療を同時に実現し得る材料として有用であると期待される。

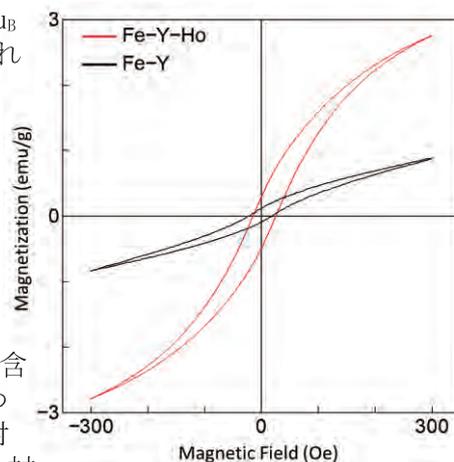


Figure 1 Hysteresis loops of samples under 300 Oe.

### Preparation of yttrium and holmium-containing garnet-type ferrite for radiotherapy and hyperthermia

Shintaro Matsumoto<sup>1</sup>, Tomoyuki Ogawa<sup>1</sup>, Masakazu Kawashita<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Tohoku University

<sup>2</sup>Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University

Tel: +81-22-795-4735, Fax: +81-22-795-4735, E-mail: shintaro.matsumoto.s4@dc.tohoku.ac.jp

## 悪性度の異なるがんの ECM を模倣した培養基板上での抗がん剤耐性の発現機構

<sup>1</sup> 山形大学有機材料システム研究推進本部, <sup>2</sup> 山形大学フロンティア有機材料システム創成フлекс大学院, <sup>3</sup> 物質・材料研究機構

○干場 隆志<sup>1,2,3</sup>

### 【緒言】

がんはその悪性化とともに抗がん剤耐性を獲得していくことが知られている。一方で、がん細胞周囲の細胞外マトリックス(ECM)も、悪性化に伴いリモデリングを受ける。しかし、悪性化に伴う ECM リモデリングが抗がん剤耐性の獲得にどのように寄与しているかはよくわかっていない。本研究では、転移性の異なる大腸がん細胞株を培養して、培養基板表に細胞が産生した ECM 成分を沈着させた後に、細胞のみを除去すること(脱細胞化)で得た ECM タンパク質を、がんの悪性化によってリモデリングを受けた ECM のモデルとして用い、5-フルオロウラシル(5-FU)耐性の発現機構を検討した。以前、悪性度の高いがん細胞が形成した ECM 上での *ABCB1* の発現上昇が生じ、5-FU 耐性が亢進することを報告した。今回は *ABCB1* の発現亢進における上皮-間葉転換(EMT)の寄与について検討した。

### 【実験】

大腸がん細胞株である HT-29(転移性)、SW480(非転移性)および正常細胞株である CCD-841-CoN を 2 週間培養後、界面活性剤および核酸分解酵素で処理することにより ECM モデルを得た。その後、HT-29 細胞を播種し、5-FU あるいは TGF- $\beta$  を添加した後、さらに培養することで各種の検討を行った。また、コンドロイチナーゼ ABC を用い、コンドロイチン硫酸鎖の分解を行った。

### 【結果と考察】

5-FU を HT-29 細胞に添加すると EMT 関連遺伝子の発現上昇を生じるとともに *ABCB1* の発現も上昇した。この発現上昇は TGF- $\beta$  受容体の阻害剤である SB431542 により抑制された。さらに HT-29 細胞由来の ECM 上で培養すると *ABCB1* の発現量が他の細胞由来の ECM と比較して高値を示したが、SB431542 により違いは観察されなくなった(右図)。この結果は悪性度の高いがん細胞由来の ECM 上での *ABCB1* の発現には TGF- $\beta$  シグナルが関与していることを示唆している。同様に、各種のがん細胞由来の ECM 上で HT-29 細胞を培養し、TGF- $\beta$  添加により EMT を誘導したところ、HT-29 細胞由来の ECM 上で EMT 関連遺伝子が高く観察された。さらにビグリカン由来とされる TGF- $\beta$  を結合するコンドロイチン硫酸(CS)鎖が HT-29 細胞由来の ECM で多く検出された。CS 鎖は TGF- $\beta$  と結合し、その活性を上方制御している。そこで、HT-29 細胞由来の ECM 中の CS 鎖を分解したところ、*ABCB1* の発現量が低下した。以上の結果から、悪性度の高いがんの ECM では CS 鎖に TGF- $\beta$  が結合し、より効率よく細胞に提示されることにより EMT を促進し、抗がん剤耐性を上昇することが示唆された。

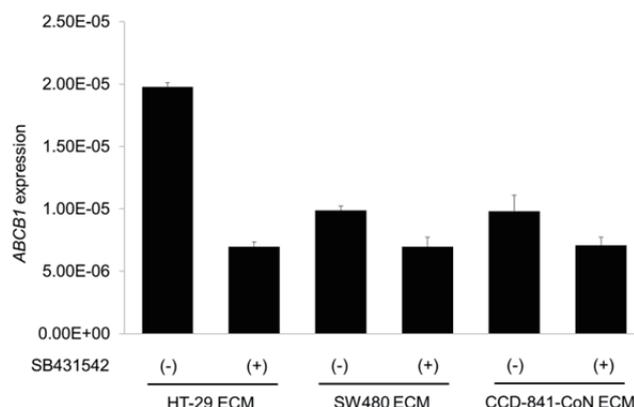


図: TGF シグナル阻害剤添加時の癌進行模倣型マトリックス上における *ABCB1* の発現

## Chemoresistance acquisition mechanism on the substratum mimicking native ECM in tumor at different malignant levels

Takashi Hoshiba<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, <sup>2</sup>iFront, Yamagata University, <sup>3</sup>National Institute for Materials Science

Tel: +81-238-26-3585, E-mail: thoshiba@yz.yamagata-u.ac.jp

## アポトーシス細胞の抗炎症活性を模倣した高分子材料(MPS)の開発

<sup>1</sup>物質・材料研究機構 WPI-MANA, <sup>2</sup>筑波大学大学院 数理物質科学研究科,  
<sup>3</sup>東京大学大学院 工学系研究科, <sup>4</sup>大阪大学附属病院 未来医療センター,  
<sup>5</sup>日本大学 理工学部物質応用化学科, <sup>6</sup>東京理科大学大学院 基礎工学研究科  
 ○中川 泰宏<sup>1,2,3</sup>, 齋藤 充弘<sup>4</sup>, 青柳 隆夫<sup>5</sup>, 荏原 充宏<sup>1,2,6</sup>

【緒言】 炎症反応の過剰・慢性発現は心疾患やアルツハイマー病などの重篤な疾患の主な原因であることが報告されている。今日ではステロイド薬剤や分子標的薬が抗炎症治療薬剤として使用されているが、近年ではこれらに変わる新たな抗炎症治療担体としてアポトーシス細胞や、それが特異的に提示するリン脂質(ホスファチジルセリン:PtdSer)を含有するリポソームが開発されている。しかし、高コスト・拒絶反応・生体内での挙動制御が困難といった課題を有しており、実用化へ向けたさらなる高機能化が求められている。我々は、アポトーシス細胞の特異的な膜表面構造を模倣した、抗炎症活性を有する材料による新規治療法の開発を目的として、PtdSerの機能性部位である頭部基を有する高分子(poly(MPS))の作製を試みた。(Fig. 1)

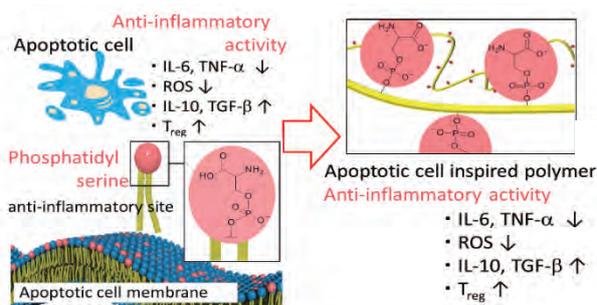


Fig. 1 Schematic illustration of apoptotic cell inspired polymers for anti-inflammation.

【実験】

### 【実験】 MPS 及び poly(MPS)の合成

Poly(MPS)の前駆体となるモノマー(MPS)の合成を試みた。DNAの固相合成に用いられるホスホロアミダイト試薬を転用する手法にて、MPSを高収率(78%)で得た。次に、フリーラジカル重合によって、MPSを重合し、*tert*-butyl hydroperoxideで酸化、TFAで脱保護反応を行うことでpoly(MPS)を得た。また、同様の手法にて2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)との共重合モデルであるpoly(MPS-*st*-MPC) (MPS:MPC = 1:9)を合成した。

### poly(MPS)の抗炎症活性評価

Poly(MPS)の抗炎症活性を評価した。マウス由来マクロファージ(RAW264.7)にlipopolysaccharide(LPS)を添加し炎症マクロファージモデルを作製し、poly(MPS)及びpoly(MPS-*st*-MPC)添加の有無による炎症活性の変化を評価した。免疫活性定量の指標として免疫反応において中心的役割を果たす転写因子の一つであるNF-κBの発現量をSEAP reporter gene assayにて定量した。

### 【結果と考察】

炎症マクロファージモデルにおいてpoly(MPS)、及びpoly(MPS-*st*-MPC)添加による用量依存的なNF-κB発現量の低下を確認した。NF-κB活性の抑制は細胞の炎症活性の抑制を強くするため、この結果はPoly-MPSが抗炎症活性を有するということを強く示唆する。また、poly(MPS)と比較してpoly(MPS-*st*-MPC)の炎症抑制効率がより高いという結果を得た。これは、poly(MPS-*st*-MPC)がアポトーシス細胞膜により近い構造を有することに起因すると考えられる。

## Development of Apoptotic Cell Inspired Polymer Materials (MPS) for Immunosuppression

Yasuhiro NAKAGAWA<sup>1,2,3</sup>, Saito ATSUHIRO<sup>4</sup>, Takao AOYAGI<sup>5</sup>, and Mitsuhiro EBARA<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

<sup>2</sup> Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba

<sup>3</sup> School of Engineering, University of Tokyo

<sup>4</sup> Development of Medical Innovation, Osaka University Hospital

<sup>5</sup> College of Science and Technology, Nihon University

<sup>6</sup> Graduate School of Industrial Science and Technology, Tokyo University of Science

Tel: +8129-851-3354, Fax: +81-29-860-4708, E-mail: EBARA.Mitsuhiro@nims.go.jp

## 2E-21

## 水熱合成した中性子捕捉療法用ホウ酸ガドリニウムの構造

東北大学大学院医工学研究科  
○三上 敬太, 川下 将一

## 【緒言】

現在、日本人の主な死因別死亡数の第一位はがんであり、低侵襲ながん治療法への需要が年々高まってきている。ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、がん細胞に集積させたホウ素化合物に熱中性子線を照射することにより、同化合物が $\alpha$ 線を放出し、がん細胞にダメージを与える治療法である。同化合物が放出する $\alpha$ 線の飛程は細胞一個分程度 ( $<10 \mu\text{m}$ ) であるため、正常細胞へのダメージを抑えることができる。BNCT と同様のコンセプトの治療法として、ガドリニウム (Gd) 化合物を使用した中性子捕捉療法 (GdNCT) がある。Gd は、熱中性子線照射により、飛程  $100 \mu\text{m}$  以下の $\gamma$ 線を放出する。この $\gamma$ 線の飛程は BNCT においてホウ素化合物が発生する $\alpha$ 線のそれより長い。Gd 化合物は核磁気共鳴画像法 (MRI) の造影剤としても働くので、MRI によって同化合物のがん細胞への集積や治療の有効性を確認できる。そこで本研究では、BNCT と GdNCT 双方の効果を期待し得るホウ酸ガドリニウム ( $\text{GdBO}_3$ ) の作製を目的とする。

## 【実験】

57 mM の塩化ガドリニウム水溶液 35 mL に 10 wt% の水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液を加えることにより、その pH を 7、10 あるいは 13 に調整した。pH 調整した  $\text{GdCl}_3$  水溶液に、0.2 M のホウ酸 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 水溶液 20 mL を加え、30 分間攪拌した。この溶液を  $200^\circ\text{C}$  あるいは  $240^\circ\text{C}$  で 24 時間水熱合成した。水熱合成終了後、溶液温度が室温程度に下がるまで待ち、遠心分離した。遠心分離して得られた沈殿物を、蒸留水とエタノールで二回洗浄した後、真空乾燥したものを試料とした。得られた試料を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し、試料の結晶相を粉末 X 線回折装置 (XRD) により調べた。

## 【結果および考察】

得られた試料の XRD パターンを図 1 に示す。pH 7 あるいは 10 の  $\text{GdCl}_3$  水溶液を用い、 $200^\circ\text{C}$  で水熱合成した試料においては、 $\text{GdBO}_3$ 、水酸化ガドリニウム ( $\text{Gd}(\text{OH})_3$ ) および塩化ナトリウム (NaCl) が生成した。一方、pH 13 の  $\text{GdCl}_3$  水溶液を用い、同様に  $200^\circ\text{C}$  で水熱合成した試料においては、 $\text{Gd}(\text{OH})_3$  のみが生成した。NaCl の生成は試料洗浄が不十分だったためと考えられる。 $\text{Gd}(\text{OH})_3$  の生成に関しては、出発溶液に多量の水酸化物イオン ( $\text{OH}^-$ ) が存在することにより、水熱合成の過程において  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  の  $\text{GdBO}_3$  への変化が妨げられたためと考えられる。pH 10 の  $\text{GdCl}_3$  水溶液を用い、 $240^\circ\text{C}$  で水熱合成した試料においては、 $\text{GdBO}_3$  のみが生成した。以上より、 $240^\circ\text{C}$  で水熱合成すれば、 $\text{Gd}(\text{OH})_3$  から  $\text{GdBO}_3$  への変化を促進できることが分かった。

pH 10 の  $\text{GdCl}_3$  水溶液を用い、 $240^\circ\text{C}$  で水熱合成した試料の SEM 観察によれば、同試料は、直径約  $20 \mu\text{m}$ 、厚さ約  $10 \text{nm}$  の円盤状結晶の凝集体であり、その粒径は約  $30 \mu\text{m}$  であった。BNCT および GdNCT においては、 $5\sim 200 \text{nm}$  程度の大きさの粒子が望ましいとされている。従って、今回得られた約  $30 \mu\text{m}$  の  $\text{GdBO}_3$  粒子をそのまま BNCT や GdNCT に用いることは難しい。水熱合成時の粒成長を抑えるためには、ポリエチレングリコール等の高分子を加える必要があると考えられる。

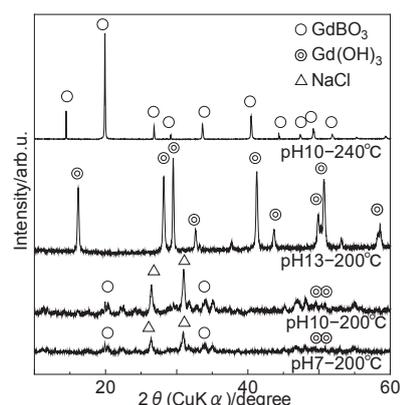


図 1 種々の pH の  $\text{GdCl}_3$  水溶液を用い、種々の温度で水熱合成した試料の X 線回折パターン

### Structure of hydrothermally synthesized gadolinium borate for neutron capture therapy

Keita Mikami, Masakazu Kawashita

Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University

Tel: +81-22-795-4735 Fax: +81-22-795-4735, E-mail: keita.mikami.r8@dc.tohoku.ac.jp

## 分解後に酸性有機化合物の生成しないポリトリメチレンカーボネート誘導体の合成

<sup>1</sup> 奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学領域, <sup>2</sup> 奈良先端科学技術大学院大学 研究推進機構

○網代 広治<sup>1,2</sup>, Nalinthip Chanthaset<sup>1</sup>, 信岡 宏明<sup>1</sup>, 前原 明梨<sup>1</sup>

### 【緒言】

超高齢社会を迎え、新しい医療材料の開発は急務と言える。生分解性高分子であるポリトリメチレンカーボネート (PTMC) へ機能性置換基が導入された高分子が、数多く報告されている。我々はこれまでに、炎症のリスクなどを低くすることを目的として、分解しても酸性有機化合物が生成しない、エステルフリー型構造にこだわって分子設計してきた。例えば、3 ユニットのオリゴエチレングリコール鎖を有する TMCM-MOE3OM (Figure 1a) では、ホモポリマーが 33°C に感熱応答を示す。

本研究では、このエステルフリー型構造が示す特徴を、エステル基を有する類似構造 MTC-MOE3OM (Figure 1b) の高分子と比較して、加水分解後の分析について考察した。さらに、合成が多段階で煩雑であるという問題に対しても、新しく開発した合成経路を、様々な置換基導入に適用した結果について考察し、当該エステルフリー型 PTMC 誘導体の合成について検討したので報告する。

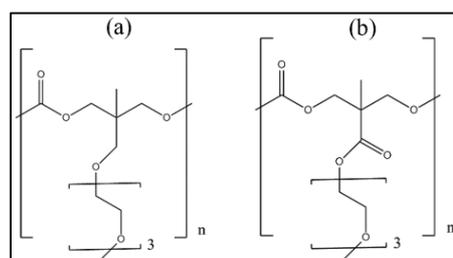
### 【実験】

エステルフリー構造を有する poly(TMCM-MOE3OM) [1] と、これのモデルとしてエステル構造を有する poly(MTC-MOE3OM) [2] を合成した。これらのポリマーは 20 mg ずつイオン交換水 13 mL に溶解させ、リパーゼ (0.005 mM) あるいは、水酸化ナトリウム (0.003 mM) によって加水分解を促進させた (n=3)。これらの水溶液は、それぞれ 30 日間 pH を測定した。

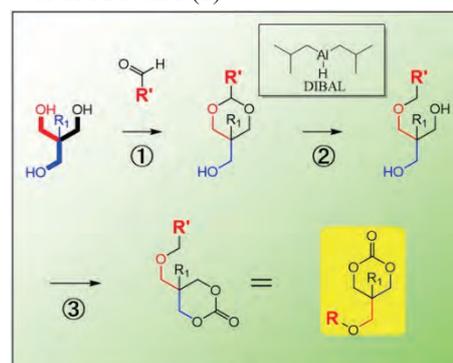
### 【結果と考察】

酵素やアルカリ条件によって加水分解した場合、poly(TMCM-MOE3OM) の場合には、そのブランクサンプルの場合とほぼ同じ pH の値を示したのに対して、エステル構造を有するモデルポリマー poly(MTC-MOE3OM) での場合には、常に酸性を示し、特に実験開始直後では大きく酸性に偏る結果となった。したがって、エステルフリー構造を持つ TMC 誘導体のポリマーが分解時に酸性有機化合物を放出せず、より生体適合性を示すことを示唆している。また Figure 2 に、当該エステルフリー型 PTMC 誘導体の合成について、最近開発した合成スキームを示す。出発物質としてトリオールを用いること、さらにアルデヒド化合物を用いることを条件として、様々なアルデヒド化合物を試した結果、現在 6 種類以上のエステルフリー型 TMC 誘導体の合成に成功した。Figure 2 に示す合成経路は、比較的汎用性に優れた合成法と考えられる。

[参考文献][1] H. Ajiro, Y. Takahashi, M. Akashi, *Macromolecules* 2012, 45, 2668. [2] R.C. Pratt, F. Niderberg, R.M. Waymouth, J.L. Hedrick, *Chem. Commun.* 2008, 114.



**Figure 1.** Polymer structure of ester-free poly (TMCM-MOE3OM) (a) and poly(MTC-MOE3OM) containing ester structure (b).



**Figure 2.** Novel synthetic route for ester free type trimethylene carbonate derivatives.

## Synthesis of poly(trimethylene carbonate derivatives) which do not produce acidic organic compounds after hydrolysis

Hiroharu Ajiro<sup>1,2</sup>, Nalinthip Chanthaset<sup>1</sup>, Hiroaki Nobuoka<sup>1</sup>, Akari Maehara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology. <sup>2</sup>Institute for Research Initiatives, Nara Institute of Science and Technology

Tel: +81-(0)743-72-5508, Fax: +81-(0)743-72-5509, E-mail:aji@ms.naist.jp

## 固相メカノケミカル反応を利用した双性イオンを有する機能性高分子の開発

<sup>1</sup> 岐阜薬科大学薬物送達学大講座薬品物理化学研究室, <sup>2</sup> 松山大学薬学部薬品物理化学研究室, <sup>3</sup> 中部学院大学人間福祉学部

○土井 直樹<sup>1</sup>, 杉山 航平<sup>1</sup>, 池上 遼<sup>1</sup>, 笹井 泰志<sup>1</sup>, 山内 行玄<sup>2</sup>, 葛谷 昌之<sup>3</sup>, 近藤 伸一<sup>1</sup>

【緒言】双性イオン型高分子は、正・負両電荷のベタイン構造を有する高分子であり、生体内の細胞膜を構成する Phosphatidylcholine を模倣していることから、生体適合性を持つバイオマテリアルに広く利用されている。しかし、双性イオン型高分子は高い水和効果を示すことから、親水性鎖と疎水性鎖から成るブロックあるいはグラフト共重合体の合成に際し、使用可能な溶媒が限定的であるために、疎水性の高い高分子鎖の導入が困難である。ところで、当研究グループはこれまでに、室温窒素雰囲気下、高分子に機械的なエネルギーを加えることで高分子の主鎖切断により惹起されるメカノラジカルについて、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル測定を行い、その詳細なスペクトルシミュレーション解析により、生成メカノラジカルの構造特性について世界に先駆け報告してきている。さらに、高分子と固体モノマーとの混合粉末を高速ボールミル振動処理することで、高分子のメカノラジカルがイニシエーターとして働き、固体モノマーの固相重合が進行することにより、ブロックあるいはグラフト共重合体が得られることを明らかにしている。そこで本研究では、双性イオン型高分子と pH 応答能を持つ疎水性固体モノマーとの固相メカノケミカル反応により、双性イオンを有する新規な機能性高分子を合成した。発表では、本反応の動力学的特性ならびに生成高分子の物理化学的特性に関する結果を報告する。また、透析膜法を用いた生成高分子の自己組織化ならびに、pH の変化によるその崩壊特性を検討した結果についても併せて報告する。

【実験】まず、Glycidyl methacrylate を水中にて 80 °C で 9 時間攪拌することにより開環した後、過ヨウ素酸ナトリウムを加え、室温で 2 時間攪拌することで、2-Oxoethyl methacrylate を合成した。続いて、弱酸性の pKa (= 5.62) を有する Pyridine を構造中に含む Isoniazid との縮合反応により、pH 応答能を有する新規な疎水性固体モノマーである 2-(2-isonicotinoylhydrazono)ethyl methacrylate (INHMA) を合成した。INHMA (50~20 mol%) と Poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) の混合粉末について、室温窒素雰囲気下、非金属製の容器およびボールを用いた高速ボールミル振動処理 (振動数 30 Hz) を種々の時間実施した。経時的な反応率について評価するため、生成物の <sup>1</sup>H-NMR 測定を行い、INHMA のオレフィンに基づくプロトンピークの減少率から反応率を算出した。また、ゲルろ過クロマトグラム (GPC) 測定を用いて、生成高分子 (PMPC-*b*-PINHM) の分子量ならびに分子量分布を評価した。次いで、10 時間の反応により得られた PMPC-*b*-PINHM をメタノールあるいは DMF に溶解させ、外相として pH 7.4 のリン酸緩衝液を用いた透析膜法による自己組織化を検討した。生成ナノ粒子の流体力学的サイズは、動的光散乱 (DLS) 法により評価した。さらに詳細な粒子形態について明らかにするため、リンタングステン酸を用いたネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡像 (TEM) を観察した。また、種々の pH (7.4~5.1) の水溶液中における、ナノ粒子のサイズの経時変化について DLS 測定により明らかにすることで、粒子の安定性ならびに崩壊特性を詳細に検討した。

【結果と考察】<sup>1</sup>H-NMR, IR, UV, HR-MS (ESI), 元素分析の結果より、pH 応答能を有する新規な疎水性固体モノマーである INHMA の生成を確認した。また、PMPC と INHMA との固相メカノケミカル反応は、反応時間に従い反応率は上昇し、10 時間で 73% の反応率を示した。次いで、経時的な生成高分子について、ゲルろ過クロマトグラフ測定を実施したところ、10 時間後の生成高分子は数平均分子量が 35,000, 多分散度が 1.82 であり、反応時間に伴い分子量の指数関数的な低下がみられ、長時間粉砕により限界分子量へと近づく結果が示された。透析膜法により得られた PMPC-*b*-PINHM から成るナノ粒子の DLS 測定より、その平均流体力学径は 120 nm であり、いずれの散乱角においても拡散係数は一定であったことから、球形の形態をとることが示唆された。また、比較検討として、pH 7.4 の 100 mM リン酸緩衝液あるいはメタノールに溶解した PMPC に

についても DLS 測定を行ったところ、散乱強度によらず粒子サイズは観測されなかったことから、PMPC-*b*-PINHM から成る生成ナノ粒子は、PINHM 鎖の疎水性相互作用により自己組織化していることが示唆された。生成ナノ粒子は、室温における pH 7.4 のリン酸緩衝液中にて、1 週間以上一定の粒子サイズを維持した。そして、水溶液の pH の低下に伴い、生成ナノ粒子の粒子サイズは段階的に低下していき、pH 5.1 の酢酸緩衝液中において完全な粒子の崩壊が認められた。以上の結果より、本研究は、双性イオン型高分子と pH 応答能を持つ疎水性固体モノマーとの固相メカノケミカル反応により、溶媒ならびに開始剤を一切加えることなく、双性イオンを有するブロック共重合体が合成可能であることを明らかにするとともに、生成高分子は pH 応答能を有する高分子キャリアとして有用であると考えられる。

---

### **Development of pH-responsive zwitterionic block copolymers prepared by mechanochemical solid-state copolymerization**

Naoki Doi<sup>1</sup>, Kohei Sugiyama<sup>1</sup>, Ryo Ikegami<sup>1</sup>, Yasushi Sasai<sup>1</sup>, Yukinori Yamauchi<sup>2</sup>, Masayuki Kuzuya<sup>3</sup>, Shin-ichi Kondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmaceutical Physical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Physical Chemistry, College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University

<sup>3</sup>Department of Health and Welfare, Faculty of Human Welfare, Chubu Gakuin University

Tel: +81-58-230-8100, Fax: +81-58-230-8114, E-mail: [doi@gifu-pu.ac.jp](mailto:doi@gifu-pu.ac.jp)

## 生体組織付着型薬剤徐放材料への応用を志向した 擬ポリロタキサンナノシートの創成

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

○前田利菜、上沼駿太郎、小林諒太、河西健吾、横山英明、伊藤耕三

### 1. 諸言

グラフェン、酸化チタン、二次元ポリマーなどに代表される二次元ナノシートは、その特異な表面電子状態や力学物性、高い比表面積を有する特徴を生かして薬剤輸送、生体材料などへの応用開発が進んでいる。一方、我々の研究室では直鎖ポリマーがシクロデキストリンに貫通することで得られる擬ポリロタキサンの自己組織化構造に注力して研究をしており、近年末端に電荷官能基を有する poly(ethylene glycol)-*b*-poly(propylene glycol)-*b*-poly(ethylene glycol) (PEO-PPO-PEO) とシクロデキストリン (CD) からなる擬ポリロタキサンが水中で剥離されたナノシート構造を自己組織的に形成することを見出した。末端に電離基を有さない擬ポリロタキサンは、分子間力によりナノシート同士が水中でお互いに吸着し層状構造を形成する。一方、擬ポリロタキサンの軸分子末端に電離基を導入すると、ナノシート同士に電荷反発が生じ、剥離したナノシートが得られたと考えられる。また、各成分の重合度の分布が揃った PEO-PPO-PEO を軸分子として用いているため、CD が包接する数と軸上での位置が決定され、厚さ 10-20nm、1 片が数  $\mu\text{m}$  の単結晶状の単離ナノシート (擬ポリロタキサンナノシート) が得られた。さらにこの擬ポリロタキサンナノシートは、(1) pH などの環境変化によって構造形成と崩壊を制御できること、(2) 非特異的相互作用および特異的相互作用により固体表面に吸着すること、(3) ナノシート構造形成時に色素分子などの異種低分子を投入すると、低分子を取り込んだナノシートが得られること、(4) 希薄条件下で取り込んだ異種低分子を徐放しながらナノシートが崩壊することがわかった。以上の特徴を踏まえて我々は、この新規擬ポリロタキサンナノシートを生体組織に付着して薬剤を徐放する新しい薬剤徐放材料としての応用を考えている。本発表では、擬ポリロタキサンナノシートの合成法や上記特徴に関する研究結果をまとめて紹介する。

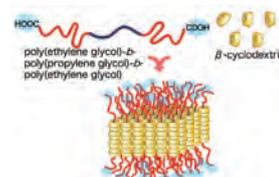


Fig. 1. Schematic illustration of pseudo-polyrotaxane nanosheet.

### 2. 実験および結果と考察

両末端にカルボン酸を有する PEO-PPO-PEO と  $\beta$ -CD を水中で混合することにより、目的の擬ポリロタキサンナノシートを得た。ナノシートの構造解析は、小角 X 線散乱 (SAXS)、広角 X 線回折測定法、走査型電子顕微鏡、および原子間力顕微鏡 (AFM) 観察により行った。Fig. 1 に示した模式図のように、両末端カルボン酸を有する PEO-PPO-PEO がシクロデキストリンの穴に貫通し、シクロデキストリンが軸高分子上で結晶化することによりナノシート構造を形成していることが明らかになった。得られた単離ナノシートがシリコン基板に付着している様子の AFM 観察結果を Fig. 2 に示す。厚さが 16nm、大きさが 1-2 $\mu\text{m}$  のナノシートが得られたことがわかった。また、シリコン基板に付着したナノシートの崩壊過程を走査型電子顕微鏡により観察したところ、ひし形状ナノシートの内部から結晶面に沿って構造が崩壊する様子が観察された。当日はモデル低分子として選択したローダミンを取り込んだ擬ポリロタキサンナノシートの作製や希薄条件下におけるナノシート崩壊に伴う低分子徐放挙動についても報告する。

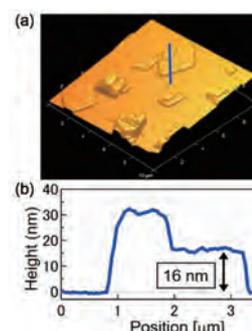


Fig. 2. AFM height image (a) and cross section profile (b) of pseudo-polyrotaxane nanosheet.

### Bioadhesive pseudo-polyrotaxane nanosheet for controlled drug release

Rina Maeda, Shuntaro Uenuma, Ryota Kobayashi, Kengo Kasai, Hideaki Yokoyama, and Kohzo Ito (Graduate school of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa-shi, Chiba 277-8561, Japan) Tel: +81-4-7136-3757, Fax: +81-4-7136-3757, E-mail: rmaeda@edu.k.u-tokyo.ac.jp

