

ポスター発表

第1日: 11月12日(月)

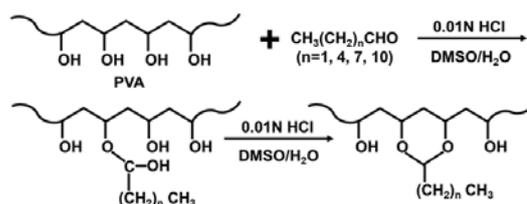
アセタール化 PVA コーティング表面の抗血栓形成性評価

¹筑波大学大学院数理物質科学研究科、²物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点バイオ機能分野
○ 陳 曦^{1,2}、田口哲志^{1,2}

【諸言】カテーテル、人工心肺、血液透析などに使用される医療機器は血液と直接接触するため、これらの材料表面には血栓形成を抑制する性質が求められる。これまでにホスホリルコリン基¹やメトキシエチル基²を有するポリマーが合成され、臨床現場においても優れた血栓形成抑制効果を示すことが明らかにされている。これらのポリマーの血栓形成抑制効果のメカニズムとして中間水の存在による血小板粘着抑制効果が提唱されている。一方、我々は生体高分子を疎水化することによる生体組織接着性の制御に成功している³。

本研究では、汎用性の高いポリビニルアルコール(PVA)をアセタール化することによって疎水基を導入した疎水化ポリビニルアルコール(Hm-PVA)を調製した。種々の鎖長を有する Hm-PVA を基材表面にコーティングした表面における血栓形成抑制効果について評価した。

【実験】Hm-PVA の合成は、ジメチルスルホキシドと水の混合酸性溶液中においてヒドロキシルのアルデヒドへの求核置換反応により合成した(スキーム1)。合成後プロトン核磁気共鳴分光(¹H-NMR)とフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)を用いて疎水基の導入を確認した。Hm-PVA の血栓形成抑制効果を評価するため、ポリプロピレン(PP)フィルムにコーティングし Hm-PVA-PP を調製した。血小板粘着試験として、サンプルを多血小板血清(PRP)中に1時間インキュベートし、血小板粘着状態を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。Hm-PVA-PP 表面に吸着するフィブリノーゲンとアルブミンの量を micro BCA 法で定量した。フィブリノーゲンの吸着構造はγ鎖の活性化で評価した。Hm-PVA の中間水量は示差走査熱量測定(DSC)を用いて算出した。血栓形成抑制効果の評価には、ラット全血を用いた。



Scheme 1. Synthesis of Hm-PVAs.

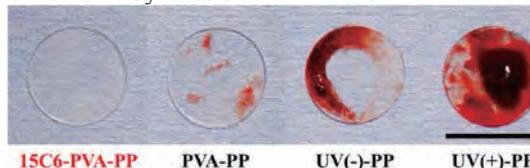


Figure 1. Anti-thrombogenic test using C6-PVA-PP, PVA-PP, UV(-)-PP and UV(+)-PP. Scale bar = 10mm.

【結果と考察】スキーム1に示すアセタール化反応より、鎖長の異なる疎水基を修飾した Hm-PVA が合成できた。また、エタノール/水混合溶媒を用いることにより Hm-PVA は PP フィルム表面にコーティングできた。それらの中で、C6-PVA コーティング PP フィルムは血小板の粘着数が有意に減少した。さらに、粘着した血小板の活性状態も抑制されていることが確認された。フィブリノーゲンについても C6-PVA コーティングにより PP フィルムと比較して有意に減少した。さらに、フィブリノーゲンのγ鎖の定量を行った結果、C6-PVA コーティング表面は、γ鎖の表面露出が抑制されることが明らかとなった。また、Hm-PVA の水和構造を DSC で解析した結果、平行膨潤時において 15C6-PVA の中間水量が最も多いことが明らかとなった。ラット全血に対する血栓形成抑制効果の評価を行った結果、図1に示すように、ネガティブコントロールの UV 処理 PP フィルムでは全領域で血栓形成が認められた。一方、C6-PVA-PP フィルム表面に血栓形成は認められなかった。そのため、C6-PVA の中間水量の増大が血栓形成抑制効果に大きな役割を果たしていると考えられた。この結果から、PVA という汎用性材料においても水和構造制御によりコーティング可能な血栓形成抑制効果を示す材料を調製できることが明らかとなった。

【引用】 [1] Ishihara, K. et al., *Polymer J.*, **1990**, 22, 355-360. [2] Tanaka, M. et al., *Biomacromolecules*, **2017**, 18, 4214-4223. [3] Taguchi, T. et al., *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2016**, 12, 128-134

Acetalized poly (vinyl alcohol)s as antithrombogenic materials

Xi Chen^{1,2}, Tetsushi Taguchi^{1,2*}

(¹Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan ² Biomaterials Field, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan)

Tel: +81-29-860-4498; Fax: +81-29-860-4714; E-mail: TAGUCHI.Tetsushi@nims.go.jp (T. Taguchi).

Effects of alkaline treatment to silicones for biocompatible crosslinked polymer coatings

¹The University of Tokyo, ²Fuji-Systems Corporation

○ FangYu Chou¹, Keiichiro Kushiro¹, Ryo Yokoi², Shintaro Hara¹, Takashi Isoyama¹, Masaki Anraku¹, Madoka Takai¹

【Introduction】 Silicone materials have been commonly used as biomaterials for biomedical devices and artificial organs because of the properties of non-toxicity, chemical stability, permeability of gases, and high mechanical durability. However, the hydrophobicity of silicone causes non-specific protein adsorption on the surface, which leads to unwanted reactions, such as immune cell adhesion and blood clotting. Previously, phosphorycholine-based crosslinking-type polymers have been developed to coat silicone that relied on the activation of the surface by oxygen plasma treatment [1]. However, oxygen plasma treatment cannot be utilized for complicated substrate geometries. Here, we investigated alkaline treatment instead of plasma treatment for the activation of silicone surfaces.

【Experiment】 Silicone plates for medical applications were used as model substrates. The coating polymer was composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), 3-(methacryloyloxy) propyl-tris(trimethylsilyloxy) silane (MPTSSi) and 3-methacryloxypropyl trimethoxysilane (MPTMSi) with the molar ratios of 54/27/19 = MPC/MPTSSi/MPTMSi. This crosslinking-type MPC copolymers were synthesized by free radical polymerization. The traditional O₂ plasma treatment was replaced by alkaline solution treatments at different temperatures in an attempt to improve reactivity of the silicone surfaces. The silicone surfaces were hydroxylated by alkaline treatments, then were coated with the 0.1wt% polymer in methanol by silane-coupling reactions. For polymer coating analyses, silicone substrates were stained by fluorescent molecule rhodamine 6G that specifically bind to MPC to evaluate the relative amount of polymer on the surface, and in addition, water contact angle measurements were conducted. For protein adsorption analysis, the relative values of adsorbed bovine serum albumin (BSA) could be analyzed from ImageJ via the fluorescence microscopy images; a substrate that shows increased intensity indicates higher levels of protein adsorption onto the surface. We evaluated the biocompatibility of coating via alkaline treatment by evaluating the viability of human lymphoblasts (CCRF) via the live/dead assay.

【Results and discussion】 The rhodamine staining and contact angle measurements of polymer-coated silicone plates using various pre-treatment methods (Fig. 1A) showed successful polymer coating on the silicone plates after being treated by alkaline solutions. The fluorescence intensities of BSA adsorbed on coated plates (Fig. 1B) demonstrated successful prevention of protein adsorption onto the coated surfaces. The protein adsorption on alkaline-treated substrates were higher than that of O₂-plasma-treated ones, because the roughness of silicone plate after being treated by alkaline solutions, which etch silicones, were greater than O₂-plasma-treated plates, which was confirmed by scanning electron microscopy. The higher roughness presumably increased the area available for protein adsorption. Interestingly, increasing the temperature of Alkaline treatments resulted in more polymer attachment but reduced protein repelling, which may be due to the etching of the silicones being greater at the high temperature. Also, cell/substrate compatibility was observed by culturing cells with the substrates for 3 days (Fig. 2). The cell viability on substrates coated after alkaline treatments was high (>99%) and same as the viability on coatings via O₂ plasma treatment. In conclusion, the biocompatible, crosslinked polymer could be successfully coated on silicones via alkaline treatments, and it prevented protein adsorption. The coating procedure with alkaline treatments on silicones is easier, more scalable than oxygen plasma treatment and it can be applied to various medical devices with complicated shapes.

Ref: [1] K. Nagahashi, Y. Teramura, and M. Takai, "Stable surface coating of silicone elastomer with phosphorylcholine and organosilane copolymer with cross-linking for repelling proteins," *Colloids Surf B Biointerfaces*, **134**, 384-91, 2015.

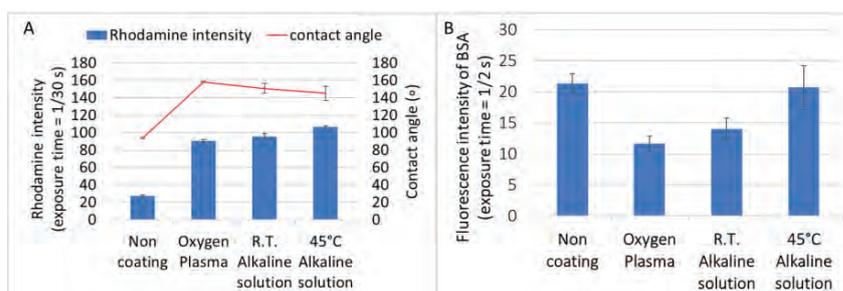


Figure 1. (A) Rhodamine-staining intensities and contact angles and (B) protein adsorption on polymer-coated silicones.

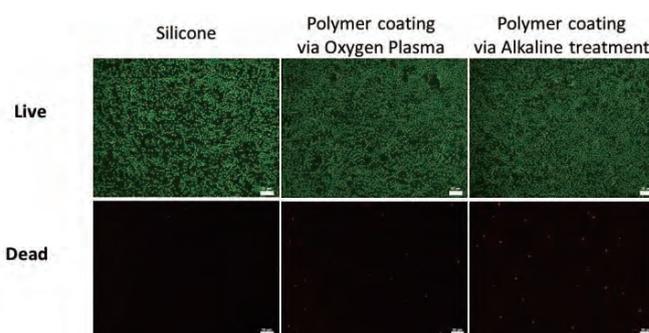


Figure 2. Toxicity determination using the live/dead viability assay (Scale bar = 50 μm).

Effects of alkaline treatment to silicones for biocompatible crosslinked polymer coatings

FangYu Chou¹, Keiichiro Kushiro¹, Ryo Yokoi², Shintaro Hara¹, Takashi Isoyama¹, Masaki Anraku¹, Madoka Takai¹

¹The University of Tokyo, ²Fuji-Systems Corporation

Tel: +81-03-6841-2959, Fax: +81-03-5841-0621, E-mail: chou@bis.t.u-tokyo.ac.jp

心筋梗塞モデルマウスで、荷電水酸化アパタイト粒子の局所投与は梗塞領域を減少させる

¹東京医科歯科大学 循環生理解析学, ²東京医科歯科大学難治疾患研究所 生体情報薬理学,

³愛知学院大学歯学部解剖学, ⁴東京医科歯科大学 循環制御内科学

○千葉 里沙子¹, 山添 正博², 井原 健介², 小室 博明¹, 永井 亜希子³, 田村 典子⁴, 平尾 見三⁴, 古川 哲史², 笹野 哲郎¹

【緒言】心筋梗塞は、冠動脈の閉塞により心筋が壊死し、心機能が損なわれる重篤な疾患である。心筋梗塞の治療は虚血領域に対する血液供給であり、冠動脈の血行再建が行われるが、困難な場合は心筋梗塞周辺領域に対する血流の増加が必要となる。我々は、荷電粒子としてhydroxyapatite electret (HA-E)を用いて、荷電ナノ粒子の局所的投与が梗塞領域に与える影響を検討した。

【実験】10~15週齢のC57BL/6Jマウスを対象とし、気管内挿管、人工呼吸下に1-2%イソフルレンを用いて全身麻酔を行い、左肋間開胸により心臓を露出し、冠動脈左前下行枝を結紮して心筋梗塞モデルマウスを作製した。冠動脈結紮直後に、左室前壁の心筋梗塞周辺領域4カ所に対して、1mg/mLのHA-E (HA-E1群)または10mg/mLのHA-E(HA-E10群)、あるいは水 (C群)を計50μL注入し、閉胸した後回復させた。手術2週間後に心エコーにて心機能を評価し、心臓を摘出した後Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)染色にて梗塞範囲の評価を行った。さらに、抗CD31抗体を用いた免疫組織染色および定量的RT-PCRにて血管新生の評価を行った。

【結果と考察】HA-E1群は、HA-E10群、C群に比し心筋梗塞2週間後の左室内径短縮率が増加傾向にあり(38.54% vs. 32.64% vs. 32.88%)、TTC染色では梗塞領域の壁厚が有意に大きく(梗塞領域の壁厚/健常領域の壁厚 78.8% vs. 40.5% vs. 42.9%, $p < 0.05$, 図1)、免疫組織染色ではCD31陽性細胞の比率が有意に高く、血管内皮細胞の増加が示唆された(3.6% vs. 2.47% vs. 1.45%, $p < 0.05$)。定量的RT-PCRではHA-E1群、HA-E10群ともにVegf、Icam-1、Vcam-1の発現量増加が見られた。以上より、心筋梗塞モデルマウスにおいて、梗塞領域周辺における適量のHA-Eの投与は、血管新生誘導により梗塞領域を減少させると考えられた。

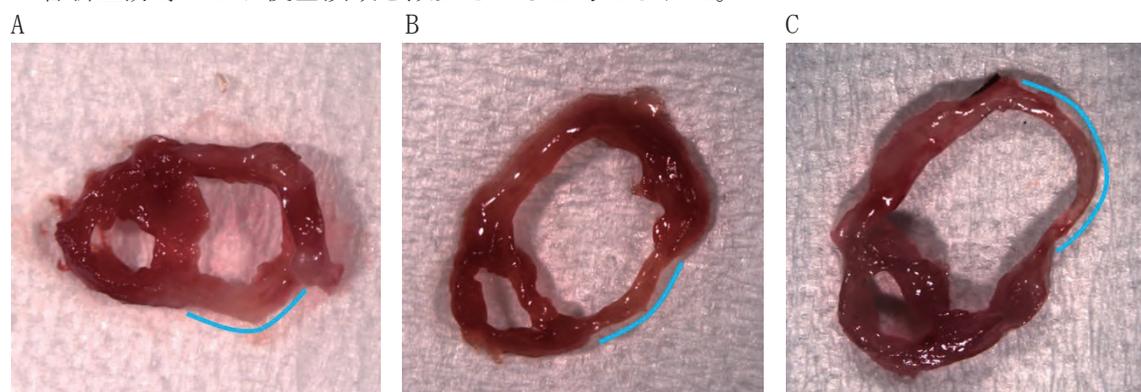


図1. TTC染色を行った組織(青線部が梗塞領域) (A)HA-E1群 (B)HA-E10群 (C)C群

Attenuation of Infarct Region by Local Injection of Hydroxyapatite Electret in Murine Myocardial Infarction Model

Risako CHIBA¹, Masahiro YAMAZOE², Kensuke IHARA², Hiroaki KOMURO¹, Akiko NAGANO³, Noriko TAMURA⁴, Kenzo HIRAO⁴, Tetsushi HURUKAWA², Tetsuo SASANO¹

¹Department of Cardiovascular Physiology, Tokyo Medical and Dental University, ²Department of Bio-informational Pharmacology, Medical Research Institute Tokyo Medical and Dental University, ³Department of Anatomy, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, ⁴Department of Cardiovascular Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-3-5803-5365, Fax: +81-3-5803-5365, E-mail: ma180050@tmd.ac.jp

高分子材料の血液適合性評価マーカの性能検証

¹ 国立医薬品食品衛生研究所, ² 東京大学, ³ 早稲田大学, ⁴ 九州大学, ⁵ Ig-M, ⁶ LSI メディエンス, ⁷ 化学物質評価研究機構, ⁸ シミックファーマサイエンス, ⁹ 日精バイリス
 ○齋島 由二¹, 井上 祐貴², 鮫島 啓³, 松橋 祐輝³, 保延 慶紀³, 福井 千恵¹, 戸井田 瞳¹, 野村 祐介¹, 森下 裕貴¹, 平井 晴香⁴, 小林 慎吾⁴, 秦 信子⁵, 森下 明彦⁵, 財前 絹子⁶, 宮浦 英樹⁷, 橘田 久美子⁸, 松田 仁美⁹, 田中 賢⁴, 岩崎 清隆³, 石原 一彦²

【緒言】生体内に埋植した医用材料は吸着蛋白質層を介して細胞・組織と相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与する。我々は、高分子材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から予測する新規評価法の確立と標準化を目指し、産官学連携のもとに研究を推進してきた。本研究では、これまでに選定した血液適合性評価用 1 次マーカ候補 (VTNC) 及び 2 次マーカ候補 (C3a, C1s) の有用性を更に検証するため、血液適合性の異なる種々の高分子材料をそれぞれ内面コーティングした拍動循環閉鎖系血液回路を作製し、血液循環に伴う回路内面への蛋白質吸着挙動を解析した。また、候補マーカの再現性、頑健性を検証するため、開放実験系を用いた 5 機関による国内ラウンドロビン (RR) テストを実施した。

【実験】材料としては、血液適合性の異なる 3 群 9 種類の高分子 (血液適合性 : 1 群>2 群>3 群、1 群 : PMEa, PEt2A, PMC3A, 2 群 : PEt2MA, PMC6A, PEtEA, 3 群 : PEA, PBuA, PEtEMA)、並びに PMPC (陰性対照) を使用した。閉鎖実験系では、拍動ポンプを組み込んだ内容量 55 mL の閉鎖型回路の内面を高分子材料で各々コーティングし、ヒト血液を充填後、平均血液流量 100 mL/min、平均圧力 70 mmHg で 37°C 下 1 時間循環させた。回路内面の吸着蛋白質は、PBS 洗浄後、M-PER 試薬を用いて回収した。得られた蛋白質試料は、常法に従って、LC-MS/MS ショットガン解析並びに多変量解析に供した。RR テスト用材料としては、PMEa, PEt2A, PMC3A, PEtEA, PEA を選定した。各材料を各々両面コーティングした PC シート (直径 33 mm) をそれぞれ個別にヘパリン加ヒト血漿に浸漬 (37°C/1 時間) した後、PBS 洗浄し、M-PER 試薬を用いて吸着蛋白質を回収した。得られた試料は Spin-X UF (Cut Off = 5 kDa) により濃縮した後、ELISA 測定に供した。

【結果と考察】閉鎖型回路内面に吸着した蛋白質の回収量は、303.5 - 1,612.7 µg/回路であり、各群の回収量自体に相関性は認められなかった。各回路から回収した蛋白質の網羅的プロテオミクス比較定量解析の結果、VTNC については、その吸着量が 1 群<2 群<3 群の順に大きくなり、血液適合性評価用 1 次マーカとしての有用性が検証された。C3a は回路接続部分に形成された血栓の影響を受け易く、吸着量が比較的高値となる傾向が認められたが、基本的には材料の血液適合性に応じた吸着挙動を示した。吸着量の少ない C1s は検出されなかった。開放実験系を用いた RR テストにおいて、VTNC は 1 群<2 群<3 群の順に吸着量が増加し、1 次マーカとしての再現性・頑健性が検証された。C1s の吸着量にも同様の傾向が認められたが、同じ 1 群に分類される PMEa 及び PEt2A と比較して、PMC3A への C1s 吸着量は若干高値を示した。また、C3a 吸着量は PMEa=PEt2A < PMC3A=PEtEA=PEA の順であったが、補体マーカの測定結果は試験機関間差のばらつきが大きいことが確認された。これらの成績から、高分子材料の血液適合性は、これらのマーカを利用して評価可能であるが、実製品の試験にあたっては、PMPC 等の陰性対照と比較評価する必要があることが明らかとなった。

Performance verification of markers to evaluate blood compatibility of polymer materials

Yuji Haishima¹, Yuki Inoue², Kei Sameshima³, Yuki Matsuhashi³, Yoshinori Honobe³, Chie Fukui¹, Hitomi Toida¹, Yusuke Nomura¹, Yuki Morishita¹, Haruka Hirai⁴, Shingo Kobayashi⁴, Shinko Hata⁵, Akihiko Morishita⁵, Kinuko Zaizen⁶, Hideki Miyaura⁷, Kumiko Kitta⁸, Hitomi Matsuda⁹, Masaru Tanaka⁴, Kiyotaka Iwasaki³, Kazuhiko Ishihara²

¹National Institute of Health Sciences, ²The University of Tokyo, ³Waseda University, ⁴Kyushu University, ⁵Ig-M, ⁶LSI Medience, ⁷Chemical Evaluation and Research Institute, ⁸CMIC Pharma Science, ⁹Nissei Bilis
 Tel: +81-44-270-6540, Fax: +81-44-270-6611, E-mail: haishima@nihs.go.jp

カチオン性疎水性ポリマーを用いたヘパリンの高分子表面への固定化

○西村 嘉純¹、中路 正^{2,3}、松村 和明¹北陸先端科学技術大学院大学¹、富山大学大学院理工学研究部²、富山大学大学院生命融合科学教育部³

【緒言】 心臓疾患を外科的手術で治療する際に、人工心肺装置を用いて一時的に患者の心臓と肺の活動を補助する。人工心肺措置の血液接触部位である人工心肺回路は個別機能品を接続する回路チューブから構成されている。抗凝固剤の血中投与は必須であるが、回路自体に凝固を抑制する機能を付与させることができれば理想的である。そこでチューブの表面に生物由来抗凝固剤であるヘパリンを用いることで、生体への低侵襲化だけでなく適切な凝固管理ができ安全な体外循環ができる。ヘパリンは分子中に負の電荷を含んでいることから、高分子基材（ポリ塩化ビニルやシリコン）表面に正の電荷を導入することで、固定化することが可能である。そのためには、正の電荷をもちながら高分子基材と相互作用の高い疎水性部位も同時に併せ持つバインダー材料の開発が望まれる。

【実験】 毒性の比較的低いカチオン性ポリマーである ϵ -ポリリジン（PLL）の 10%ジメチルスルホキシド溶液を作製し、所定量のドデシルコハク酸無水物（DDSA）と 100°Cで 2 時間反応させることでアルキル基を導入した。蒸留水を用いて再沈殿を行い、ポリマーを回収した。¹H-NMR で構造確認を行い、DDSA 部位がアミノ基に対して 20%–40%の導入量であるポリマーを得た。回収後、各ポリマーの 1%メタノール溶液にシリコンゴムを浸漬し、洗浄・乾燥をして、高分子固定化シリコンゴム試料を得た。続いてコートしたシリコンゴムに 1%のヘパリン水溶液を添加し、洗浄、乾燥し、ヘパリンコートシリコンゴム試料を得た。シリコンゴム表面の水接触角を測定し、コーティングの確認を行うとともに、ヘパリンコート前後の XPS 測定、 ζ 電位測定により、ヘパリンの固定化を確認した。

【結果と考察】 Figure1 の水接触角測定よりヘパリン固定後のシリコン表面は親水性を示していることが分かった。ヘパリンはスルホン酸基を含んでいるためシリコン表面が親水性に変わったと考えられる。Figure2 は各サンプルにおける ζ 電位測定の結果を示す。DDSA の導入率が 20–30%のポリマーコートに対しては負の電荷を示していることからヘパリンの結合が確認できたが、40%ポリマーコートではプラスの ζ 電位であった事から、うまくヘパリンがコートできていないことが示唆された。これは、DDSA の導入に伴い、ポリマーのカチオン性が減少し、ヘパリンとの相互作用が低くなった結果と考えられる。

【結言】 作製したバインダー分子の PLL-DDSA を用いることで高分子基材の表面及びヘパリンの固定化が可能であった。ヘパリン固定後は接触角の測定から親水性を示しており、 ζ 電位、XPS 測定より DDSA 導入率が 20–30%の時ヘパリンの結合において最適であることが確認できた。

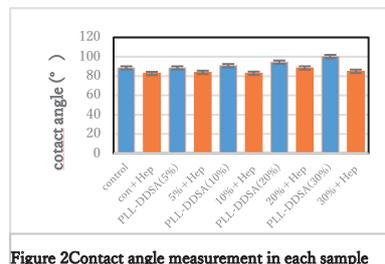
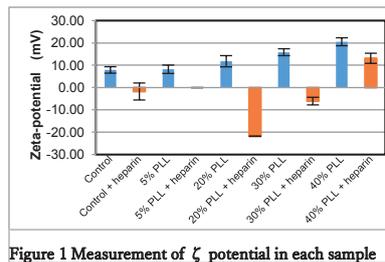


Figure 2 Contact angle measurement in each sample

Figure 1 Measurement of ζ potential in each sample

Immobilization of heparin on polymer surface using cationic hydrophobic polymer

Kazumi Nishimura¹, Tadashi Nakaji-Hirabayashi^{2,3}, Kazuaki Matsumura¹

¹Japan Advanced Institute of Science and Technology,²Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama,³Graduate School of Innovative Life Science, University of Toyama

電気化学処理による抗菌性と硬組織適合性を両立したチタン表面の創製

¹東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科, ²東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
○島袋 将弥¹, 堤 祐介², 山田 理沙¹, 蘆田 茉希², 陳 鵬², 土居 壽², 野崎 浩佑²,
埴 隆夫²

【緒言】近年、材料表面でのバイオフィーム形成を主因とした感染症や炎症の長期化によるインプラント体の緩みが問題視されており、細菌制御技術の確立が喫緊の課題となっている。バイオフィーム形成防止のためには、細菌の付着および増殖を抑制することが有効と考えられており、材料表面に抗菌性が求められる。一方で、確実な骨機能再建のためには、硬組織適合性が必須であり、抗菌性と両立が求められる。そこで本研究では、既に硬組織適合性向上に十分な効果が認められている電気化学的処理の1つである Micro-arc oxidation (MAO) 処理に着目した。MAO 処理では、処理溶液の成分の取り込みを利用することで、カルシウムやリンを含んだ酸化物層の形成が可能であることから、抗菌効果が期待される銀、銅、亜鉛を追加導入することで、抗菌性と硬組織適合性を両立したチタン表面の創製が期待される。すなわち、本研究では MAO 処理の応用によって、抗菌性と硬組織適合性を両立したチタン表面の創製が可能であるかを抗菌性評価と骨芽細胞を用いた *In vitro* 硬組織適合性評価によって検証した。

【実験】工業用純チタン (JIS2 種, 8 mmφ) を厚さ 1.5 mm に切断し、表面を #800 まで湿式研磨した試料に対して、上限電圧 400 V、処理時間 600 s、電流密度 251 A m⁻² の条件で MAO 処理を行った。電解溶液の基本組成を、0.15 M 酢酸カルシウム、0.10 M グリセロリン酸カルシウムとし、これに 0~2.5 mM の硝酸銀、塩化銅、塩化亜鉛のいずれかを添加した混合溶液を用いた。MAO 処理を施した試料に対して SEM/EDS および XPS による表面分析を実施し、生理食塩水中での各イオンの溶出挙動を ICP-AES によって評価した。抗菌性評価として、JIS Z 2801 に準拠し、黄色ブドウ球菌および大腸菌を用いてフィルム密着法を実施した。また *In vitro* 硬組織適合性評価として、マウス頭頂骨由来の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用いて細胞増殖、および骨分化特性の評価を実施した。

【結果と考察】

SEM/EDS の結果から、MAO 処理によってチタン表面上に多孔質酸化物層が形成されており、この酸化物層はカルシウム、リンに加えて微量の銀、銅、亜鉛を含有していた。XPS の結果から、銀、銅、亜鉛はそれぞれ異なる化学結合状態となっており、生理食塩水中への各金属イオンの溶出挙動も異なっていた。抗菌性評価の結果では、黄色ブドウ球菌および大腸菌に対して元素特有の抗菌効果を発現しており、銀含有試料では両細菌に対して殺菌的作用、銅または亜鉛含有試料では両細菌に対して静菌的作用を示した。*In vitro* 硬組織適合性評価の結果では、最も高濃度条件で銀を導入した試料を除く、すべての試料で MC3T3-E1 細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。また高い抗菌効果を示した銀含有試料を用いて ALP 活性、石灰化挙動を評価した結果、銀は、ALP 活性や石灰化に影響を及ぼさないことが示された。以上の結果より、抗菌性と硬組織適合性の両立が可能であることが明らかとなった。すなわち、MAO 処理の応用によって、チタン表面上に微量の銀、銅、亜鉛を導入することで相反する 2 つの生体機能性の同時獲得が可能であることを見出した。

Development of the antibacterial titanium surface combined with hard tissue compatibility by electrochemical treatment

Masaya Shimabukuro¹, Yusuke Tsutsumi², Risa Yamada¹, Maki Ashida², Peng Chen², Hisashi Doi², Kosuke Nozaki², Takao Hanawa²

¹Graduate School of Medical and Dental sciences, Tokyo Medical and Dental University

²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-3-5280-8011, E-mail: shimabukuro.met@tmd.ac.jp

イノシトールリン酸を利用した多孔質水酸アパタイトセラミックスへの亜鉛イオンの固定化とその抗菌性

明治大学大学院 理工学研究科

○上田 綾乃, 本田 みちよ, 相澤 守

【緒言】 現在、手術後に発症する感染症を未然に防止することを目的とした、耐感染性を備えた抗菌性インプラントの開発に注目が集まっている。本研究では、多孔質水酸アパタイト (HAp) セラミックスに、キレート能を有するイノシトールリン酸 (IP6) を表面修飾し、その IP6 を介して抗菌性を有するイオンのひとつである亜鉛イオンを固定化する技術の確立に取り組んだ。今回は、得られた亜鉛イオン固定化多孔質 HAp セラミックスの材料特性および抗菌性を評価したので報告する。

【実験】 アパタイトファイバー (AF) の合成 [1] および多孔質 HAp セラミックスの作製 [2] は、既報にしたがって行なった。得られた多孔質 HAp セラミックスを、1000 ppm の IP6 溶液 5 cm³ に浸漬し、減圧脱気を行なった後、37°C で 24 時間静置した。さらに、濃度を 0, 50, 100, 300, 500 mmol・dm⁻³ に調製した塩化亜鉛 (ZnCl₂) 水溶液に浸漬させ、15 分間減圧脱気を行ない、亜鉛イオン固定化多孔質 HAp セラミックスを作製した。なお、サンプルの略号は、「Zn(X)」と表記し、カッコ内の X は浸漬させた ZnCl₂ 溶液の濃度である。材料特性評価として、X 線回折法 (XRD) による結晶相の同定、走査型電子顕微鏡法 (SEM) による微細構造の観察、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) による元素の定量分析を行なった。また、HEPES 緩衝液を用いた亜鉛イオンの溶出試験を行なった。作製した試料片の抗菌性評価は、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) と大腸菌 (*E. coli*) を用いて阻止円法により行なった。

【結果と考察】 得られた試験片は亜鉛濃度にかかわらず HAp 単一相であり、SEM 観察からは、繊維状の AF 同士が絡み合って焼結していることが分かった。また、気孔率は約 70% であった。次に、亜鉛イオン固定化多孔質 HAp セラミックスの各 ZnCl₂ 濃度における亜鉛吸着量を図 1 に示す。濃度に依存して亜鉛の吸着量が増加した。HEPES 緩衝液での亜鉛イオン溶出試験の結果から、亜鉛吸着量が多い試験片ほど亜鉛イオンの溶出量も多いことが分かった。また、浸漬時間の増加とともに溶出量は増加し、浸漬後 6 時間で溶出する亜鉛量はプラトーに達した。図 1 の結果と比較すると、Zn(500) の亜鉛固定化多孔質 HAp セラミックスに吸着している亜鉛量の約 21% が溶出していた。抗菌性試験の結果より、Zn(300), (500) は *S. aureus* および *E. coli* のどちらの菌種に対しても、抗菌性を発現することが分かった。この結果は、抗菌剤である亜鉛イオンが試料片から溶解し、菌の生育を妨げたためであると考えられる。さらに、亜鉛イオン担持量が増加すると、阻止円が大きくなることも明らかになった。これらの結果より、IP6 のキレート能を利用すると、多孔質 HAp セラミックスに亜鉛イオンを固定化できることが明らかになった。また、この試料片は *S. aureus* および *E. coli* に対して抗菌性を発現したことから、術後感染を防止する新規な抗菌性人工骨としての応用が期待できる。

[1] M. Aizawa *et al.*, *Biomaterials*, **26**, 3427-3433(2005).

[2] M. Kawata *et al.*, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **15**, 817-823(2004).

Immobilization of zinc ions to property to porous hydroxyapatite ceramics using inositol phosphate and their anti-bacterial property

Ayano Ueda, Michiyo Honda, Mamoru Aizawa

School of Science and Technology, Meiji University

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

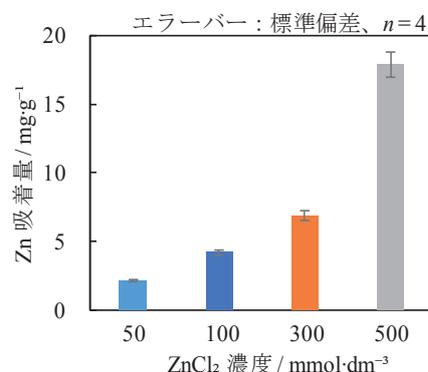


図 1. 多孔質 HAp セラミックスへの亜鉛吸着量

三次元積層造形による連通孔をもつアルミナ多孔質焼結体の作製

¹東京工業大学 物質理工学院 材料系

○横井 理史¹, 生駒 俊之¹

【緒言】

腫瘍の摘出や外傷によって、自然治癒では再生しない大きな骨欠損が生じることがある。これを補填するため、複雑な形状の骨欠損部に精密に一致する人工骨が求められている。しかし、機械加工性に乏しいセラミックス製の人工骨は臨床現場で成形することが難しい。このような問題を解決する手段として、インクジェット粉末積層技術（以下、3Dプリンター）を利用した、リン酸三カルシウムや生体ガラス、石膏などの原料を複雑形状のオーダーメイド型人工骨に造形する報告がなされている^[1]。これらの殆どは、原料粉末の水和硬化反応を利用しているが、デキストリンやポリビニルアルコールを被覆した粉末を用いた造形も報告されている。しかし、骨組織を侵入させるための数百 μm の孔を形成させる成型精度に乏しく、また十分な強度が得られていないなどの課題がある。そこで本研究では、高分子を被覆した水硬性アルミナの3Dプリンターによる造形について検討した。作製した多孔質成形体及び焼結体の機械的特性や精度を評価した。

【実験】

平均粒径 48 μm の水硬性アルミナ粒子 (pA) にエチレン-酢酸ビニル共重合体 (S) を 7:3 の重量比になるように被覆した。被覆した粉末を、重量比に対応して pA+3S と略す。被覆した高分子の質量分率は、熱重量・示差熱分析 (TG-DTA) の結果から算出した。これに、焼結性向上のために平均粒径 0.18 μm の α -アルミナ微小粒子 (A018) を 20wt% となるように混合し、3Dプリンター (Projet® 460Plus, 3D Systems 社製) に導入した。バインダーには Visijet PXL Clear (3D Systems 社製) を用いて、直径 5.0 mm × 高さ 10 mm の円柱状の成形体を作製した。また、三方向から連通させた直径 1 mm の孔をもつ立方体 (10 mm 立方) の成形体を作製した。成形体を 90°C の湿潤環境下に静置することで水和物の析出を促し、さらに 1500°C で 5 時間焼成した。作製した成形体と焼結体の圧縮強度を測定した。各試料の結晶相は、粉末 X 線回折測定 (XRD) で同定し、焼結後の内部構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

【結果と考察】

pA+3S では 31.2% のエチレン-酢酸ビニル共重合体が含まれていることが分かった。pA+3S を用いて作製した成形体 (ϕ 5.0 mm × 高さ 10 mm) の圧縮強度は 248 kPa であり、焼結後は 3.54 MPa となった。A018 を混合した粉末を用いると成形体は 226 kPa であり、焼結体は 5.44 MPa まで向上した (図 1)。焼結後の気孔率はそれぞれ 79.9% と 74.6% であった。XRD により結晶相を同定した結果、成形体を湿潤環境下に静置することで針状の水和物が析出し、複雑に絡み合っていることが分かった。さらに、焼結することで相転移が起こり α -アルミナ焼結体が得られた。焼結体の内部構造を観察した結果、粒子間のネットワークに 10~30 μm の隙間がある多孔構造が観察された。また、 α -アルミナ微小粒子を混合することによってネックが成長し、これにより焼結後の強度が上昇したと考えられる。多孔質な立方体の成形体では、直径 1 mm の孔を連通させることができた。孔の直径は、造形方向 (X, Y, Z 方向) に対してそれぞれ 0.89 ± 0.07 mm、 1.04 ± 0.06 mm、 1.01 ± 0.02 mm であった。

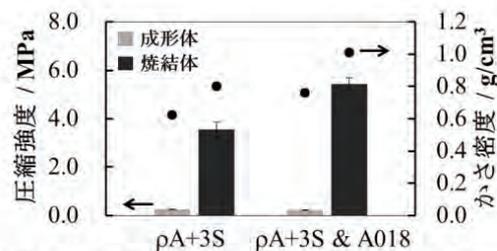


図1 成形体と焼結体の圧縮強度と密度

[1] H. Saijo, et al., *Journal of Artificial Organs*, 12(3) (2009) 200-205.

Fabrication of alumina porous sintered body with interconnective pores with three-dimensional layered modeling

Satoshi Yokoi¹, Toshiyuki Ikoma¹

¹Department of Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

Tel: +81-03-5734-3960, Fax: +81-03-5734-3369, E-mail: tikoma@ceram.titech.ac.jp

スラリー埋没加熱処理による Sr 含有アパタイト被膜の形成とその骨芽細胞石灰化促進効果

¹ 北見工業大学 大学院工学研究科 バイオ環境化学専攻, ² 北見工業大学 大学院工学研究科 医療工学専攻, ³ 北見工業大学 工学部 地球環境工学科
○駒井 しおり¹, 平野 満大², 大津 直史³

【緒言】チタン(Ti)は医療用インプラントの材料として広く用いられているが、硬組織親和性が乏しいため、骨形成に長時間を要する。当研究室では、リン酸カルシウムスラリーを用いた表面処理方法(以下、スラリー埋没加熱処理)を開発し、Ti 表面に膜厚数十ナノメートルのアパタイト(Ap)被膜を形成することに成功した¹⁾。この被膜を有する Ti 表面で骨芽細胞様細胞を培養すると未処理 Ti と比較して骨形成能が促進されることを報告している²⁾。他方、骨分化を促進する効果がある物質として近年 Sr が注目されており、Sr をドープした Ap により骨分化が増進されたとの報告もある³⁾。そこで本研究では、Sr 塩を含むリン酸カルシウムスラリーで Ti 基板を処理することで Sr を含む Ap 被膜の形成を試み、骨芽細胞様細胞を用いて Sr ドープによる石灰化増進効果を評価した。

【実験】試料は、エメリー紙#1200 で研磨した Ti 基板を第三リン酸カルシウム粉末(CP : 3Ca₃(PO₄)₂·Ca(OH)₂)と 0.1~3 M 硝酸ストロンチウム(Sr(NO₃)₂)溶液で調整したスラリーに埋没し、大気雰囲気下 650°C で 2 h 保持することで作製した。試料表面の化学組成及び Sr 含有量は、線光電子分光法(XPS)及び蛍光 X 線分析(XRF)でそれぞれ評価した。また試料からの Sr 溶出量は、試料を 37 °C に保持したリン酸緩衝液(PBS)中で 24 時間振とう浸漬した後、PBS 中の Sr 濃度を黒鉛炉原子吸光光度法(GF-AAS)で定量分析することで評価した。さらに、試料の骨形成性能は、オートクレーブ滅菌後の試料表面にヒト骨芽細胞様細胞 Saos-2 を播種し、一定期間培養後石灰化により沈着したカルシウムを定量することで評価した。

【結果】図 1 は種々濃度の Sr を含むスラリーで処理した Ti 表面を、XRF で測定して得た、Sr 由来のピーク強度である。スラリー中の Sr 濃度の増加に伴い、被膜中に含まれる Sr 量が増加することがわかった。また、XPS により化学組成比を計算したところ、Ca/P 比は 1.70 であったが(Ca+Sr)/P 比は 2.11 であった。すなわち、Sr は Ap の Ca と置換しているのではなく、被膜に Ap と Sr の状態で存在していることが示唆された。さらに、溶出試験の結果、いずれの試料からも Sr の溶出を確認し、スラリー中の Sr 濃度が高いほど、被膜からの Sr 溶出量が大きくなる傾向であることが分かった。骨芽細胞培養によるカルシウム沈着量の定量評価の結果は発表当日に報告する。

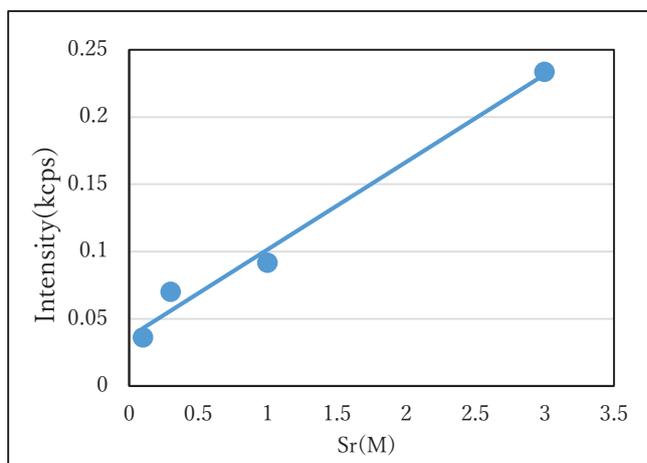


図 1:各試料表面における XRF スペクトルのピーク強度

- 1) N.Ohtsu, Y.Nakamura, S.Semboshi, Surf. Coat. Technol. 206 (2012) 2616-2621
- 2) N. Ohtsu, M. Hirano, H. Arai, J. Biomed. Mater. Res. A 102 (2014) 3838-3845
- 3) V. Aina, L. Bergandi, G. Lusvardi, G. Malavasi, F. E. Imrie, I. R. Gibson, G. Cerrato, D. Ghigo, Mater. Sci. Eng. C 33 (2013) 1132-1142

Evaluation of calcification on titanium coated by strontium and apatite through chemical treatment process using calcium-phosphate slurry

Shiori Komai¹, Mitsuhiro Hirano², Naofumi Ohtsu³

¹ Biotechnology and Environmental Chemistry, Kitami Institute of Technology, ² Medical Engineering, Kitami Institute of Technology, ³ School of Earth, Energy and Environmental Engineering, Kitami Institute of Technology
Tel :0157-26-9561 E-mail: m1852500043@std.kitami-it.ac.jp

ゼラチン粒子と硫酸カルシウムとを同時添加した β-リン酸三カルシウムセメントの生体内反応

¹明治大学, ²グンゼ株式会社

○島川 楓¹, 永田幸平¹, 木南啓司², 中野和明¹, 長屋昌樹¹, 長嶋比呂志¹, 相澤 守¹

【緒言】現在、骨補填材として臨床応用されているリン酸カルシウムセメント (CPC) は水酸アパタイトとして硬化するため、長期間体内に残存することが問題になっている。我々は、イノシトールリン酸 (IP6) を表面修飾することで、生体吸収性の高い β-リン酸三カルシウム (β-TCP) が主結晶相のまま硬化する「キレート硬化型β-TCP (IP6/β-TCP) セメント」の開発に成功している[1]。また、この IP6/β-TCP セメントにゼラチン粒子を添加すると生体吸収性が向上することも明らかにしている[2]。本研究では、さらなる生体吸収性の向上を目指し、IP6/β-TCP セメントに、ゼラチン粒子に加えて、「硫酸カルシウム半水和物 (CSH; 半水セッコウ)」を添加し、得られたセメント硬化体の生体内反応を調べたので報告する。

【実験】セメント原料粉体の調製は既報[1]にしたがって行なった。原料粉体に対して、まず 140 °C で 3 h 熱脱水架橋したゼラチン粒子を 10 mass%となるように混合し、ついで CSH を 18 mass% となるように添加した。混練液はリン酸水素二ナトリウム、クエン酸、アルギニン酸ナトリウムを純水に溶解して調製した。混合粉体と混練液とを固液比が 1/0.90 [g/cm³] となるように混練して「セメントペースト」を調製した。生物学的評価は、CSH 無添加および CSH 添加セメントペーストを on site で調製し、ブタ脛骨の欠損部に充填して 12 w 埋入した。取り出したサンプルから非脱灰研磨標本を作製し、トルイジンブルー (TB) 染色を行ない、画像解析により生体吸収率を以下の計算式より算出した。

$$\text{生体吸収率 (\%)} = [\text{欠損部面積 (mm}^2) - \text{セメント残存面積 (mm}^2)] / [\text{欠損部面積 (mm}^2)] \times 100$$

【結果と考察】組織学的評価より、IP6/β-TCP セメント硬化体の場合は大部分が残存していたが、ゼラチン粒子 (Gel) や CSH を添加した硬化体では、それらのほとんどが吸収され、新生骨に置換されていた。IP6/β-TCP セメント単味の生体吸収率は約 40% であったのに対し、ゼラチン粒子添加および、ゼラチン粒子および CSH 同時添加の場合、それらの吸収率は約 80% に向上した。これは、ゼラチン粒子の溶出による気孔形成および CSH の高い溶解性に起因しているものと考えられる。

以上の結果から、キレート硬化型 β-TCP セメントにゼラチン粒子および CSH を添加したセメントは、優れた生体吸収性を備えたペースト状人工骨であることがわかった。

[1] T. Konishi *et al.*, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **24**, 1384-1394 (2013).

[2] K. Kiminami *et al.*, *J. Ceram. Soc. Japan*, **126**, 71-78 (2018).

***In vivo* reaction of β-tricalcium phosphate cement with simultaneous addition of gelatin particles and calcium sulfate**

Kaede Shimakawa¹, Kohei Nagata¹, Keishi Kiminami², Kazuaki Nakano¹, Masaki Nagaya¹, Hiroshi Nagashima¹, Mamoru Aizawa¹

¹Meiji University, ²GUNZE LIMITED

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

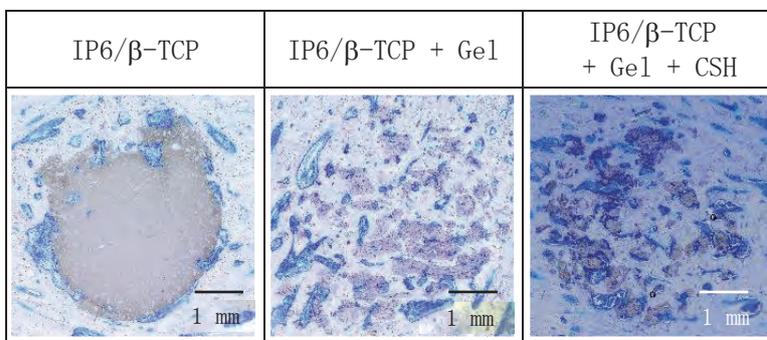


Fig. 1 Comparison of living reaction among three kinds of IP6/β-TCP cements (TB stain).

Zr-1Mo 合金表面における細胞の増殖性および接着性の影響

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, ²東京医科歯科大学生体材料工学研究所
 ○小澤 直樹¹, 陳 鵬², 蘆田茉希², 土居 壽², 堤 祐介², 埴 隆夫²

【緒言】

磁気共鳴画像(MRI)検査において、体内に金属材料を埋入されていると、金属デバイスが磁化され MR 画像に欠損や歪み（アーチファクト）が生じ、診断を妨げてしまうことがある。アーチファクトを軽減するためには金属材料の低磁化率化が必要であり、当研究室では低磁化率かつ機械的性質が良好な Zr-1mass%Mo 合金を開発している。しかし、Zr-1Mo 合金を医療材料として用いるために最も重要である生体安全性については詳細に評価していない。そこで本研究では、繊維芽細胞様細胞および骨芽細胞様細胞を用いた細胞増殖試験を行い、すでに体内埋入部材に使用されている金属試料と比較することにより Zr-1Mo 合金の細胞適合性を評価した。

【実験】

熱間鍛造 Zr-1Mo 合金およびコントロール試料（CP Ti、Ti-6Al-4V ELI 合金、SUS316L ステンレス鋼）の各直径 8 mm 丸棒材を切り出し、SiC 耐水研磨紙を用いて湿式研磨をし、各試料の表面粗さ Sa を揃えた。70%エタノールで各試料を滅菌した後に、4 種類の細胞株（L929、NIH/3T3、MC3T3-E1、MG-63）を用いて、5 日間の細胞増殖評価を行った。Cell counting kit-8 (cck-8, Dojindo) を用いて試料表面での生細胞数を測定した。また、10%中性緩衝ホルマリン溶液により細胞の固定を行い、乾燥後に走査型電子顕微鏡（SEM）により各試料表面を観察した。

【結果と考察】

表面粗さ Sa を揃えた各試料表面に 4 種類の細胞株を用いた増殖試験結果から、Zr-1Mo 合金とコントロール試料との間で細胞数に有意差はみられなかった。このことから、繊維芽細胞様細胞および骨芽細胞様細胞において、Zr-1Mo 合金は CP Ti、Ti-6Al-4V ELI 合金、SUS316L 鋼と同様に細胞毒性が低いことが明らかとなった。例として、L929 細胞での細胞増殖試験結果を図 1 に示す。また、L929 細胞において、SEM 観察（図 2）により、Zr-1Mo 合金上での細胞形態は CP Ti や Ti-6Al-4V ELI 合金と同様な伸長形態（elongated morphology）であり、また SUS316L 鋼は拡張形態（extended morphology）であることが確認できた。

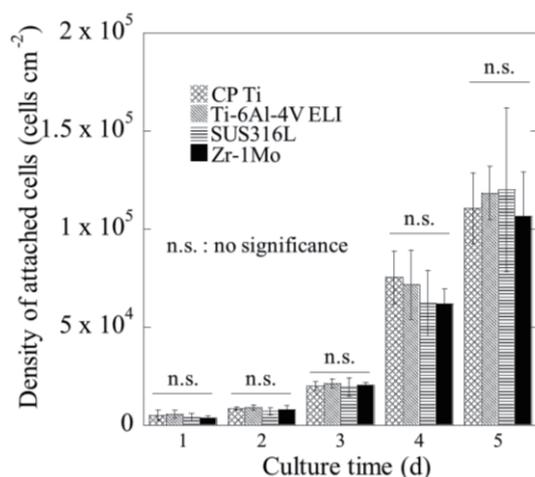


図 1. L929 細胞増殖試験結果

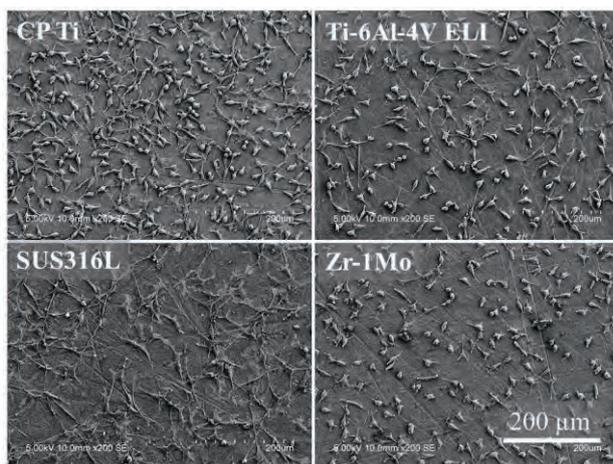


図 2. L929 細胞を播種した各試料表面の SEM 像

Effects of Zr-1Mo alloy on cell attachment and proliferation of four mammalian cell types

Naoki OZAWA¹, Peng CHEN², Maki ASHIDA², Hisashi DOI², Yusuke TSUTSUMI², Takao HANAWA²

¹Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University ²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-3-5280-8011, Fax: +81-3-5280-8011, E-mail: ma170031@tmd.ac.jp

ミネラル周囲の水和構造と硬組織形成への影響

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, ²九州大学先導物質化学研究所
 ○岡田 正弘¹, ハラ エミリオ¹, 田中 賢², 松本 卓也¹

【緒言】硬組織形成過程においてミネラルが生成・成熟する環境は時間的空間的に変化する。例えば、骨形成においては、含水率 60%程度の有機質中でミネラルが生成し、ミネラル生成量の増加とともに有機質分解・代謝および水分が脱離することによって、成熟骨の含水率は 10~20%にまで変化する。また水は、骨の強さに直接影響することや、水和構造を介してミネラルの配向化に寄与することがこれまでに示唆されている。

我々はこれまでに、人工合成したミネラル（アパタイト）周囲に状態の異なる水（結合水、中間水、自由水）が存在し、含水率によって水和構造が変化することを報告した。

本研究では、硬組織形成過程における水と置換イオンの役割についてより詳細な知見を得ることを目的とし、生体ミネラル中で含有量の高いマグネシウム（Mg）を置換したアパタイトの水和構造とタンパク質吸着特性を評価し、さらに Mg イオンが硬組織形成に及ぼす影響を検討した。

【実験】アパタイトは湿式法により合成し、その結晶構造およびイオン組成は X 線回折（XRD）および X 線光電子分光（XPS）から評価した。含水量の異なるアパタイトを凍結し、その後の昇温過程を示差走査熱量計（DSC）にて解析した。また、フーリエ変換赤外分光（FT-IR）により水素結合状態を評価した。タンパク質吸着特性にはウシ血清アルブミンおよびシトクロム c を用いた。妊娠 10 日目のマウスに Mg 含有量の異なる飼料を与え、胎生 14.5 日において胎児頭頂骨を採取し、石灰化球サイズを定量化した（岡山大学動物実験委員会承認番号：OKU-2017328）。

【結果と考察】XPS および XRD 測定から、無置換アパタイトおよび Mg 置換アパタイトの合成を確認した。DSC 測定の結果から、Mg 置換によって中間水量が増加することが確認された。また、FT-IR 測定の結果から、アパタイト周囲に存在する中間水は、水素結合ネットワークが発達した状態であることが示された。ここで、各アパタイトの表面は二価陽イオン欠損型であり、Mg 置換によって二価陽イオン欠損度が大きくなる（つまり、(Ca+Mg)/P 比が小さくなる）ことが確認され、陽イオン欠損度に応じてリン酸イオンは HPO_4^{2-} の状態で存在していると考えられる。これらの結果から、アパタイト表面に存在するプロトンによって周囲の水の水素結合ネットワークが発達することで、アパタイト周囲に中間水層が形成することが示唆された。

各アパタイトのタンパク質吸着特性を評価した結果、Mg 置換アパタイトに対する酸性タンパク質および塩基性タンパク質の吸着量はともに低下した。つまり、中間水層の存在によってアパタイト表面へのタンパク質吸着は抑制されることが示された。

Mg 含有量の異なる飼料を与えた妊娠マウスから採取した胎児頭頂骨における初期石灰化物の観察結果から、Mg イオンの存在によって石灰化球サイズが低下することが確認された。ここで、石灰化球は板状アパタイト結晶が放射状に成長した球状粒子であり、アパタイトの結晶成長を阻害する有機質が周囲に大量に存在するにも関わらず、石灰化球はほぼ同じ大きさに成長することが観察された。形成初期段階にある石灰化球はサイズが小さいために結晶間隔が狭く、中間水層の存在によって有機質が吸着しにくいためにアパタイト結晶は成長できる一方で、石灰化球がある一定の大きさまで成長すると結晶間隔が大きくなるために有機質に覆われて石灰化球の成長が停止する。このようにアパタイト周囲に存在する中間水層の存在によって、石灰化球のサイズ分布が一様になることが示唆された。

Water structuring on minerals and its role in bone tissue formation

Masahiro Okada¹, Emilio Hara¹, Masaru Tanaka², Takuya Matsumoto¹

¹Department of Biomaterials, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

²Soft Materials Chemistry, Institute of Material Chemistry and Engineering, Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University

Tel/Fax: +81- 86-235-6666, E-mail: m_okada@cc.okayama-u.ac.jp

炭素繊維強化 PEEK 樹脂複合材を用いた大腿骨近位部固定ネイルの開発 —臨床治験の短期成績—

¹大阪大学大学院医学系研究科運動器医工学治療学, ²大阪医療センター整形外科, ³株式会社ビー・アイ・テック, ⁴尼崎中央病院整形外科, ⁵大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科
○高嶋 和磨¹, 中原 一郎², 板東 舜一³, 田村 和則¹, 中矢 亮太⁴, 濱田 英敏⁵, 安藤 渉¹, 高尾 正樹⁵, 菅野 伸彦¹

【緒言】

炭素繊維強化 PEEK 樹脂複合材 (CFR/PEEK) は、優れた強度・耐摩耗性・生体親和性を有しており、骨折治療インプラントや人工関節の新規材料として臨床応用が期待されている。CFR/PEEK は金属材料のような疲労現象がなく、その耐疲労特性により、インプラントの疲労破損防止効果が期待でき、更に、炭素繊維の配列により剛性設計が自由にできることから幅広い剛性調整が可能である。また、CFR/PEEK は X 線透過性を有するため、骨接合術等の通常 X 線透視下に行われる手術においては術中の整復位を確認する上で有用であるとともに、術後の詳細な骨形成、骨癒合評価も容易となる利点を有する。現在、大腿骨近位部骨折に対する標準治療の一つとして、金属製の Y 型ネイルを使用した骨接合術があげられるが、インプラントの破損や、X 線非透過性のため整復位、骨癒合の評価が困難な症例を経験する。我々は、上記既存の金属製骨折治療インプラントの課題克服を目指し、CFR/PEEK を用いた大腿骨近位部固定ネイルを開発し、2018 年 3 月より臨床治験を開始している。その短期臨床成績について報告する。

【実験】

2018 年 3 月より大腿骨近位部骨折に対して、CFR/PEEK ネイルを用いて骨接合術を施行した、8 例 8 関節を対象とした。男性 1 例、女性 7 例、平均年齢は 85.4 歳 (72-95) で、平均 Body Mass Index は 19.3 kg/m² (15.9-22.2) で、骨折型は Evans 分類 Grade 1、2、3、4 が各々、1 例、4 例、1 例、2 例であった。評価項目として、手術時間、出血量、X 線学的評価として、生田分類での骨折部の整復位、Tip Apex Distance (TAD)、cut out、骨癒合率を評価した。

【結果と考察】

術後平均観察期間は 2.6 ヶ月 (1-4) で、平均手術時間は 29.1 分 (16-64)、平均出血量は 63.8ml (30-120) で、全例手術遂行に問題はなかった。X 線学的評価として、骨折部の整復位は生田分類 subtype A、N、P が各々、3 例、5 例、0 例であった。平均 TAD は 13.4 (10.4-16.3) で、術後観察期間中に cut out やインプラント破損を生じた症例はなかった。術後 3 ヶ月以上追跡できた、5 例で全例骨癒合が得られ、骨癒合までの平均期間は 3.4 ヶ月 (3-4) であった。少数例、短期評価ではあるものの、CFR/PEEK ネイルの術後成績は良好であった。X 線透過性を有する CFR/PEEK ネイルは、術後 3 か月で整復位及び骨形成を評価することができた。

Development of intramedullary proximal femoral nail using carbon fiber reinforced polyetheretherketone –Short outcomes of clinical trial–

Kazuma TAKASHIMA¹, Ichiro NAKAHARA², Shunichi BANDOU³, Kazunori TAMURA¹, Ryota NAKAYA⁴, Hidetoshi HAMADA⁵, Wataru ANDO¹, Masaki TAKAO⁵, Nobuhiko SUGANO¹

¹Department of Orthopedic Medical Engineering, Osaka University Graduate School of Medicine

²Department of Orthopedic Surgery, National Hospital Organization Osaka National Hospital

³B.I.TEC Co., Ltd.

⁴Department of Orthopedic Surgery, Amagasaki Chuo Hospital

⁵Department of Orthopedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine

Tel: +81-6-6879-3271, Fax: +81-6-6879-3272, E-mail: t.kazuma@hotmail.co.jp

QCM 法による義歯床用金属材料への唾液糖タンパクの吸着解析

鶴見大学歯学部歯科理工学講座
○廣田正嗣, 吉田英史, 早川 徹

【緒言】義歯床用金属材料は、義歯装着直後から腐食や変色、デンチャープラークの付着などを惹起する。例えば、チタン床については、黒変あるいは、より多量のカンジダ付着が経験的に論じられているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。そこで口腔内における各種義歯床用金属材料の表面に対するタンパク質吸着特性を明らかにする基礎実験として、本研究ではナノグラムレベルで吸着特性を定量化できる水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用い、金 (Au)、コバルトクロム合金 (Co-Cr) および純チタン (Ti) への唾液糖タンパクであるアルブミンおよびムチンの吸着解析を行った。

【実験】吸着挙動の測定には周波数 27MHz の高感度 QCM 装置 (AFFINIX QN μ , ULVAC, JAPAN) を使用し、Au, Co-Cr および Ti センサーを装着して測定した。唾液糖タンパクには、アルブミン (BSA, ウシ血清由来, WAKO) とムチン (MCN, ブタ胃由来, WAKO) を使用し、1.0 mg/mL の BSA/PBS および MCN/PBS 溶液を調整した。センサーを装着した QCM セル内 (温度 25°C) に 0.5 mL の PBS (pH=7.4) を注入後、BSA/PBS および MCN/PBS 溶液を 50 μ L 滴下し、振動数の変化を 120 分間測定した。測定終了後、BSA および MCN 吸着による振動数の変化より各種金属センサーへの BSA および MCN の吸着量を算出した。得られたデータは、一元分散分析後、Bonferroni の多重比較検定 (危険率 5%) にて統計解析を行った。

【結果と考察】Fig 1 に BSA, Fig 2 に MCN の吸着による振動数減衰曲線を示す。BSA, MCN いずれも測定開始直後から振動数の減少が認められたが、BSA では Co-Cr センサー, MCN では Au センサーにおいても最も大きな減衰を示した。

BSA および MCN の 120 分後の吸着量 (Table 1) を示す。BSA では Ti センサーにおいて有意に小さな吸着量を示し、MCN では Au センサーにおいて大きな吸着量を示す傾向であった。

以上、本研究において各種義歯床用材料への唾液糖タンパクの吸着挙動は、唾液糖タンパクの種類と金、コバルトクロム合金および純チタンのそれぞれの組合せによって異なる挙動を示す可能性が示唆された。

Table 1 BSA, MCN の吸着量 (ng/mm²)

	Au	Ti	Co-Cr
BSA	321.1 (29.5) ^a	191.7 (74.3) ^b	402.2 (52.9) ^a
MCN	338.3 (87.0) ^c	210.7 (29.5) ^{c,d}	192.3 (100.9) ^d

() : 標準偏差, 同一文字有意差なし (p>0.05)

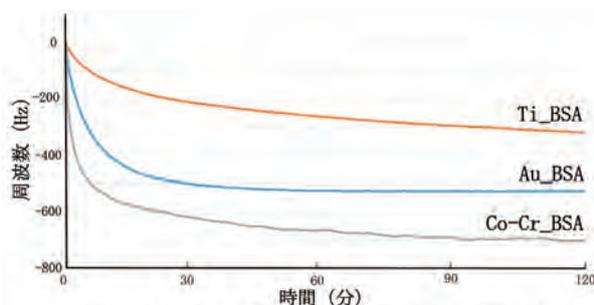


Figure 1 アルブミン吸着による振動数減衰曲線

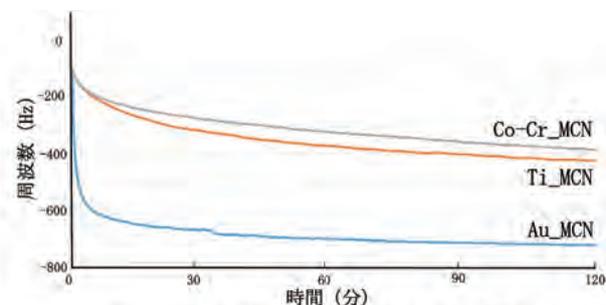


Figure 2 ムチン吸着による振動数減衰曲線

Analysis of Salivary Glycoprotein Adsorption to Denture Base Metal Using a Quartz Crystal Microbalance Method

Masatsugu Hirota¹, Eiji Yoshida¹, Tohru Hayakawa¹

¹Department of Dental Engineering, Tsurumi University School of Dental Medicine

Tel: +81-45-580-8369, Fax: +81-45-573-9599, E-mail: hirota-masatsugu@tsurumi-u.ac.jp

新規超弾性形状記憶合金 Ti-Mo-Sn-Zr の耐食性評価

¹東北大学大学院歯学研究科, ²東北大学大学院医工学研究科

○布目 祥子¹, 王 鋭^{1,2}, 横田 琴音¹, 古谷 真衣子¹, 金高 弘恭^{1,2}, 五十嵐 薫¹

【緒言】

形状記憶効果は、1951年に米国コロンビア大学の Read らによって、Au-Cd 合金において世界で初めて見出されたことに始まり、1963年に Ni-Ti 合金、1970年代はじめに Cu-Al-Ni 合金など、様々な組成においても形状記憶効果が発現することが明らかになってきている。このような中、Ni-Ti 合金は、安定した形状記憶効果と超弾性特性を有していることに加え、形状回復温度を体温付近に設定できるため生体内での使用が可能であり、卓越した医療用生体材料として広く利用されている。しかし現在、医療分野で超弾性形状記憶合金として唯一実用化されている Ni-Ti 合金は、高いアレルギー性や発ガン性が報告されているニッケル (Ni) を構成元素として半量程度も含有するため、近年その生体安全性が疑問視されている。そのため、臨床の現場ではそのような問題点を解決した新しい超弾性形状記憶合金の開発が望まれていた。そこで我々は、Ni など生体為害性の高い元素を含まず、生体材料としての実績があり生体安全性の高い金属元素から構成される新しい4元素合金として組成制御した Ti-Mo-Sn-Zr 合金(以下 TMSZ)を新しく開発し、純チタンと同等の優れた生体適合性を有することを過去に発表した。(J of Biomater Appl. 2015) 一方で、近年のフッ化物配合歯磨剤やフッ化物洗口の普及により、フッ化物含有環境下での Ni-Ti 合金の耐食性低下に関する報告がなされるようになってきている。本研究では TMSZ の材料特性についても評価を進めるため、フッ化物含有環境下での耐食性を検討した。

【実験】

非消耗 W 電極型アーク溶解炉を利用し、1個 20g の Ti-Mo-Sn-Zr 合金 (以下 TMSZ と略) のインゴットを作製した。その後、均質化処理および水焼き入れを施した後、熱間圧延により厚さ 0.25mm の板状とし、直径 15mm の円板を作製した。また、比較対象として工業用純チタン (JIS H 4600 2 種) を用い同じ形状の円板を作製した。試料表面は機械研磨機を用いて、エメリー研磨紙 #600 までの研磨を行った。試験溶液として、人工唾液(Fusayama saliva)、および 900ppm フッ化物洗口液(オラブリス洗口用顆粒 11%, 昭和薬品化工株式会社)を作製し、各試験溶液に各ワイヤー試料を 10 分浸漬後、20mV/分の走査速度にてアノード分極試験を実施した。さらに、分極試験前後の表面構造の変化を走査型電子顕微鏡 (SEM), X 線回折法 (XRD), X 線光電子分光法 (XPS) を用いて解析した。

【結果と考察】

アノード分極試験において人工唾液中では 2 種の金属試料の分極曲線は類似していた。一方、900ppm フッ化物洗口液中では TMSZ の方が Ni-Ti と比較し耐食性がやや高い傾向が認められた。また、表面構造分析の結果、SEM において、Ni-Ti においては孔食像が認められたのに対し、TMSZ について 900ppm フッ化物洗口液において明らかな腐食像は認められなかった。

以上の結果より、超弾性を示す、ニッケルフリー新規形状記憶合金である TMSZ 合金は Ni-Ti と比較し、同等以上の耐食性を有することが示唆された。

Evaluation of corrosion resistance of new shape memory alloy in fluoride-containing environments

Shoko NUNOME¹, Rui WANG^{1,2}, Kotone YOKOTA¹, Maiko FURUYA¹, Hiroyasu KANETAKA^{1,2}, and Kaoru IGARASHI¹

¹Tohoku University Graduate School of Dentistry

²Tohoku University Graduate School of Biomaterial Engineering

Tel: +81-22-717-8419 Fax: +81-22-717-8419 E-mail:shoko.nunome.b6@tohoku.ac.jp

傾斜機能型ナノハイブリッドチタンが歯髄幹細胞に及ぼす影響

愛知学院大学歯学部有床義歯学講座

○青柳 敦士, 秦 正樹, 松川 良平, 今西 悠華, 小島 規永, 尾澤 昌悟, 武部 純

【緒言】顎骨内に埋入されたインプラントが恒常的に維持されその機能を保つためには、埋入後の初期安定性と二次安定性が重要な因子である。当研究室では、二次安定性の早期獲得による治療期間の短縮や骨質の劣る部位への適応範囲拡大を目的として、純チタン(c.p.Ti)表面に陽極酸化・水熱処理(SA処理)を施し、ナノ構造を有する陽極酸化被膜上にbioactiveなハイドロキシアパタイト(HA)を析出させた傾斜機能型ナノハイブリッドチタンについて検討してきた。Bionertとbioactiveの両方の長所を兼ね備えたこの複合材料は、完成度の高いインプラント材として期待できるものである。

演者らは、骨組織が減少した骨-インプラント界面部における早期のオッセオインテグレーション獲得へ向けた治療戦略として、多分化能を有し採取時の侵襲が少なく、抽出が容易な歯髄幹細胞(Dental pulp stem cells:DPSCs)を生体材料と移植する方法が有効であると考えている。そこで、本研究ではc.p.Tiインプラント表面にSA処理を施した傾斜機能型ナノハイブリッドチタンがDPSCsの増殖・分化へ与える影響について検討を行ったので報告する。

【実験】実験試料は、c.p.Tiと β -グリセロリン酸ナトリウム(0.01mol/l)と酢酸カルシウム(0.15mol/l)からなる電解質溶液中にてc.p.Tiに放電陽極酸化処理を施したチタン(AO処理c.p.Ti)、その後、水熱処理を施したチタン(傾斜機能型ナノハイブリッドチタン:SA処理c.p.Ti)を用いた。DPSCsは、6週齢雄性SDラットの下顎中切歯抜歯後、トリプシンコラゲナーゼを用いた酵素処理によって分離・培養し継代後、以下の実験を行った。

①歯髄幹細胞の同定

培養細胞について、CD29, CD34, CD45, CD49dおよびCD90抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。次に間葉系幹細胞の分化誘導用培地を用いて、脂肪細胞と骨芽細胞への分化誘導を行った。その後、FABP-4免疫染色、osteocalcin免疫染色を行った。

②チタン上のDPSCsの反応

SA処理c.p.Ti上でDPSCsを培養し、反応を検討した。はじめに、細胞増殖活性(Cell Counting Kit-8)の測定を行った。次に、培養3, 5, 7日後の電子顕微鏡(SEM)による細胞形態の観察、培養3, 5日後のリアルタイムPCRによる骨形成関連遺伝子発現を検討した。

【結果と考察】c.p.Ti表面へSA処理を施すことにより、ナノ構造を有する陽極酸化被膜が形成され、さらに被膜上にHA結晶の析出が確認された。DPSCsの表面抗原は、CD29, CD49d, CD90が陽性、CD34, CD45は陰性であった。FABP-4免疫染色、osteocalcin免疫染色陽性より脂肪分化、骨分化が確認された。

試料表面上におけるDPSCsの反応は、細胞増殖活性では、SA処理c.p.Tiにおいて有意な発現は認められなかった。SEMの結果より、細胞突起の伸展および接着状況が観察された。リアルタイムPCRの結果よりSA処理c.p.Tiでは培養3, 5日後においてオステオポンチン、オステオカルシンの有意な発現が確認された。これらは、SA処理c.p.Tiの物理化学的な表面性状が、遺伝子発現に影響を与えたと推察された。

本研究の結果より、SA処理c.p.Tiの表面性状は、DPSCsの骨形成関連遺伝子発現を促進させることが確認された。

Effects of the physicochemical properties of functionally graded nanohybrid titanium on dental pulp stem cells

Atsushi Aoyagi, Masaki Hata, Ryouhei Matsukawa, Yuka Imanishi, Norinaga Kojima, Shogo Ozawa, Jun Takebe

Department of Removable Prosthodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

Tel: +81-52-759-2152, Fax: +81-52-759-2152, E-mail: atsushi3701@gmail.com

Effect of Nanoporous Titanium Doped with Nano-Silver and Coated with NAC

¹大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座

○Yuanyuan Yang¹, Zhang Honghao¹, 小正 聡¹, 吉峰茂樹¹, 岡崎定司¹

【緒言】 Previously, we demonstrated that strong alkali treatment of titanium generates a basic, hydrophilic sodium titanate layer with nanonetwork structure. These materials exhibit enhanced osteogenic activity *in vitro* and *in vivo*, are fabricated in controllable conditions without heating and hence consume minimal energy, are environmentally friendly, and less expensive. However, these materials are susceptible to bacterial attachment and biofilm formation, which may easily result in infection post-implantation or in long-term peri-implantitis²⁰. In this study, titanium with nanonetwork structure (TNS) was further modified with Ag nanoparticles by immersing in AgNO₃, followed by ultraviolet chemical reduction to enhance its antibacterial activity. In addition, the material was coated with NAC through layer-by-layer assembly method to reduce intracellular ROS levels and further enhance the antibacterial effect. We anticipate that our results will provide a rationale for applying NAC and Ag on orthopedic and dental implants.

【実験】 To generate surface nanonetwork structures, titanium discs were immersed in 10 M NaOH at 30°C for 24 h, rinsed several times with ion-exchanged water until the conductivity of the solution dropped below 5 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$. Subsequently, some alkali-treated discs were immersed in 0.1 M AgNO₃ at 40°C for 3 h, lightly washed in deionized water, air-dried, irradiated for 15 min at $\lambda = 254 \text{ nm}$ and 100 mW/cm^2 , and ultrasonically washed in ion-exchanged water for 1 min. For coating, Ag-doped discs were immersed in 2 mM and 5 mM NAC and air-dried on a clean bench in several cycles until appropriate amounts of NAC were deposited. All titanium discs were divided into the following four groups: TNS (titanium with nanonetwork structure), TNS-Ag (Ag-doped titanium with nanonetwork structures), Ag-NAC-2 (Ag-doped titanium with nanonetwork structures coated with 2 mM NAC) and Ag-NAC-5 (Ag-doped titanium with nanonetwork structures coated with 5mM NAC). Surface characteristics (SEM, XPS and contact angle), bacterial experiments (*S. aureus* (ATCC 12600) and *A. oris* (MG-1)), and cell experiments (Cell viability) were each conducted in triplicate. All quantitative results were expressed as means \pm standard deviations. Results were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post hoc test using SPSS 20.0 software (IBM Co., Armonk, NY, USA); $p < 0.05$ was considered statistically significant.

【結果と考察】 Importantly, TNS doped with Ag-NPs and coated with N-acetyl cysteine has similar antibacterial activity against *S. aureus* as TNS doped with only Ag-NPs, and inhibited bacterial attachment, proliferation, and biofilm formation by *A. oris*. However, TNS doped with Ag was significantly cytotoxic for rat bone marrow mesenchymal stem cells, whereas TNS doped with Ag and coated with N-acetyl cysteine supported cell viability and differentiation to a certain extent by suppressing overproduction of intracellular reactive oxygen species. In conclusion, titanium with nanonetwork structures were sequentially doped with Ag nanoparticles to enhance antibacterial activity and then coated with NAC to improve biocompatibility. Compared to titanium with nanonetwork structures, Ag-doped titanium with nanonetwork structures exhibited significantly decreased hydrophilicity, which was, however, restored by coating with NAC. Ag-doped titanium with nanonetwork structures was also strongly antibacterial and cytotoxic to a certain extent for rat bone marrow mesenchymal stem cells. Coating with NAC did not compromise the antibacterial activity, but effectively improved biocompatibility by suppressing intracellular ROS production. Thus, NAC coating may be of clinical use in Ag-doped titanium implants with nanonetwork structures.

Antibacterial Activity and Biocompatibility of Nanoporous Titanium Doped with Silver Nanoparticles and Coated with N-Acetyl Cysteine

Yuanyuan Yang¹, Zhang Honghao¹, Satoshi Komasa¹, Shigeki Yoshimine¹, Joji Okazaki¹

¹Department of Removable Prosthodontics and Occlusion, Osaka Dental University

Tel: +81-90-3924-0801, Fax: +81-72-864-3176, E-mail: yang-y@cc.osaka-dent.ac.jp

筋組織再生へ向けた磁気誘導タンパク質デリバリーによる脂肪由来幹細胞の分化誘導

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎口腔外科学分野, ²京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻生体機能高分子学分野

○木下 直哉^{1,2}, 佐々木 善浩², 河崎 陸², 丸川 恵理子¹, 原田 浩之¹, 秋吉 一成²

【緒言】口腔領域悪性腫瘍術後の患者では再建皮弁の萎縮などによる構音・嚥下機能低下が生じる。特に舌はこれらの機能に重要な役割を担っており、筋組織による舌の再生が可能となればその恩恵は大きい。我々は、多糖ナノゲルと磁性ナノ粒子のハイブリッドが、極めて効率的なタンパク質キャリアとして機能することを明らかにしてきた[1, 2]。本研究ではこの磁性ナノゲル法により、筋芽細胞分化因子を脂肪由来幹細胞に導入し、筋組織再生医療への応用について検討した。

【実験】ビーグル犬の脂肪組織より単離した脂肪由来幹細胞 (ADSC) を用い、筋芽細胞分化因子 (myo-D) を複合化させた磁性ナノゲルを外部磁場条件下で 24 時間インキュベートさせた。その後、細胞を回収してスフェロイドを作成し力学的強度を上げ、細胞の足場となるハイドロキシシアパタイトナノ粒子をコーティングした後、ヌードマウス舌へ移植を行った。筋芽細胞は細胞同士が融合することにより多核化し、成熟するにつれ細胞核は線維周囲へと移動する。一方で再生過程にある新生筋線維の核は細胞の中心に位置するため、中心核筋線維は筋再生の指標と考えられている。この形態的特徴を用い、移植後 4 週、8 週の HE 染色像における中心核筋線維数を計測することにより舌筋組織再生の評価を行った。

【結果と考察】脂肪由来幹細胞へ磁性ナノゲル法を用いた myo-D の導入による細胞分化誘導を行った ADSC とハイドロキシシアパタイトナノ粒子 myo-D の磁気誘導デリバリーにより分化誘導を行った細胞からなるスフェロイド移植群ではコントロール群と比較し、中心核筋線維数の有意な増加が認められた。以上の結果から、磁性ナノゲルによって myo-D の効率的な導入が行われ、舌筋組織再生への応用の可能性が示唆された。

[1] R. Kawasaki; Y. Sasaki; K. Katagiri; S. Mukai; S. Sawada; K. Akiyoshi. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 11377-11381 (2016)

[2] K. Katagiri; K. Ohta; K. Inumaru; K. Hayashi; Y. Sasaki; K. Akiyoshi. *ChemPlusChem.* **79**, 1631-1637 (2014)

Differentiation of adipose-derived stem cells by magnetically-induced protein delivery for potential application in muscle regenerative medicine

Naoya KINOSHITA^{1,2}, Yoshihiro SASAKI², Riku KAWASAKI², Eriko MARUKAWA¹, Hiroyuki HARADA¹, Kazunari AKIYOSHI²

¹Department of Oral Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University

²Department of polymer chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

酸化グラフェンスキャフォールドへの亜鉛担持による抗菌性の向上

¹北海道大学大学院歯学研究院 歯周・歯内療法学教室

²株式会社日本触媒

○西田 絵利香¹, 宮治 裕史¹, 薮 佳奈子¹, 菅谷 勉¹, 小野 博信²

【緒言】

我々は近年、酸化グラフェン (GO) 配合スキャフォールドが、細胞増殖、血管新生、そして優れた骨・歯周組織再生効果を示すことを明らかにした。しかし口腔内は術後感染により再生治療が失敗するケースも多い。したがって、抗菌性を有する機能性スキャフォールドの開発が求められている。重金属の亜鉛 (Zn) イオンは抗菌性を示すことが報告され、抗菌性マテリアルへの応用が進んでいる。そこで本研究では GO スキャフォールドへの Zn 担持を試み、その抗菌性と細胞親和性について検討した。

【実験】

GO (0.01%, 日本触媒) の N-メチル-2-ピロリドン (NMP) 分散液に、酢酸亜鉛 (0.001~1%) を添加して、GO/Zn 分散液とした。コラーゲンスキャフォールド (6×6×3mm, テルダーミス, オリンパステルモバイオマテリアル) を GO/Zn 分散液, あるいは GO 分散液, 酢酸亜鉛溶液のみに浸漬後, エタノール系列にて洗浄, 乾燥させて GO/Zn, GO, Zn スキャフォールドとした。

まず, 各スキャフォールドの XRF 及び XRD 測定を行った。次に口腔内細菌である *Streptococcus mutans* (ATCC35668) と *Actinomyces naeslundii* (ATCC27039) を用いて細菌培養試験を行った。スキャフォールドに各菌懸濁液 (6.0×10^6 CFU/mL) を播種, 嫌気下にて培養後, 5 時間後に LIVE/DEAD 染色を行った。また, 24 時間培養後に培地の濁度測定を行った。次に, 骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞 (1×10^4 cell) をスキャフォールドに播種培養し, 細胞増殖量の計測と LIVE/DEAD 染色を行った。

【結果と考察】

XRF 測定の結果, 酢酸亜鉛の添加濃度に依存してスキャフォールドへの Zn 担持量が増大した。Zn 担持量は GO の有無に関連を認めなかった。また, XRD 測定の結果, GO/Zn あるいは Zn スキャフォールドからは $\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_8$ のピークが同定された。

濁度測定試験の結果, GO/Zn スキャフォールドは強い濁度増加抑制を示した。GO/Zn スキャフォールドの抑制効果は両菌種に対して発現した。酢酸亜鉛濃度の違いによる濁度の差は見られなかった。LIVE/DEAD 染色では, 酢酸亜鉛濃度が 0.01% 以上で多くの死菌をスキャフォールドに認めた。

細胞培養試験では酢酸亜鉛を添加しても細胞増殖性に差を認めなかった。LIVE/DEAD 染色でも死細胞の増加は認めなかった。

以上より, Zn を担持した GO スキャフォールドは優れた抗菌性を示すとともに, 細胞親和性が良好であることが示唆された。

Evaluation of antibacterial properties of collagen scaffold containing zinc and graphene oxide

Erika Nishida¹, Hirofumi Miyaji¹, Kanako Shitomi¹, Tsutomu Sugaya¹, Hironobu Ono²

¹Department of Periodontology and Endodontology, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University

²NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

Tel: +81-11-706-4266, Fax: +81-11-406-4334, E-mail: erikanishida@den.hokudai.ac.jp

歯科用コンポジットレジンの MPC ポリマーによる *in situ* 細菌感染予防とその物理的耐久性

¹自治医科大学歯科口腔外科学講座, ²東京大学大学院工学系研究科

○小山 潤^{1,2}, 深澤 今日子², 井上 祐貴², 石原 一彦², 森 良之¹

【緒言】現在、う蝕治療の歯科用修復物としてコンポジットレジン(CR)が広く使用されている。しかしながら、CRの表面に *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)などのう蝕原因菌が付着することによって二次う蝕が起こることが問題となっている。う蝕原因菌はタンパク質の吸着層が主となるデンタルプラークの中に存在するため、二次う蝕を抑制するためにはCR表面へのタンパク質吸着層の形成を抑制することが必須である。そこで、タンパク質や細胞、細菌の付着を抑制する2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)ポリマーに着目した。本研究では、MPCポリマーにより口腔内でCR表面を処理し、タンパク質吸着層形成および細菌付着を抑制することを目的とする。口腔内で処理するためには、歯肉、頬粘膜、舌等の口腔内軟組織に侵襲を与えないような溶媒の選択や反応条件が必要となる。そこで、歯科治療で通常用いられている光反応を用いてCR表面にMPCポリマーを結合させることにした。具体的には、側鎖に重合性基(CH₂=C)を有するMPCポリマー(PMAMA: poly[MPC-co-2-aminoethyl methacrylate (AEMA) -co-N-methacryloylethyl methacrylamide (MAEMA)])溶液をCR表面に塗布し、光照射することで、CR表面の未反応の重合性基(CH₂=C)とMPCポリマーを化学結合させた。表面処理後のCR基板の表面特性およびタンパク質吸着、細菌付着、バイオフィーム形成挙動の評価を行った。また、我々は毎日のように歯ブラシによるブラッシングを行う。CR表面に化学結合したMPCポリマーの物理的耐久性の評価を行うために歯ブラシによる摩擦試験を行い、その後のCR基板の表面特性について評価を行った。

【実験】PMAMAを高分子反応により合成した。PMAMAのエタノール溶液をCR表面に小筆を用いて塗布した後、光照射を20秒間行うという作業を2回行い、これを試料とした。試料の表面解析としてX線光電子分光法による表面元素分析、静的接触角測定、ムチンの吸着量測定及び*S. mutans*菌の付着試験、バイオフィーム形成試験を行った。また、摩擦試験は摩擦試験機とその治具に取り付けた歯ブラシを用いて行った。摩擦試験後のCR基板の表面特性についても上記と同様の方法で表面解析を行った。

【結果と考察】PMAMA70をCR表面に処理した場合、CR表面の水接触角は66°から32°に低減し、親水性表面となった。また、ムチンの吸着量は93.3%減と大きく減少した。*S. mutans*の付着試験においても、付着細菌数は60.0%減、バイオフィーム形成量は60.6%減であった。これらの結果から、PMAMAは40秒間の実用時間での光照射でCR表面に結合可能であり、ムチンの吸着、*S. mutans*菌の付着、バイオフィームの形成を有効に抑制した(図1)。本研究の防汚処理法は実際の歯科臨床での操作手順に対応しており、歯科用修復物の二次う蝕を予防する新しい表面処理方法として期待できる。尚、歯ブラシ摩擦試験後のCR基板の表面特性の評価結果については当日報告する。

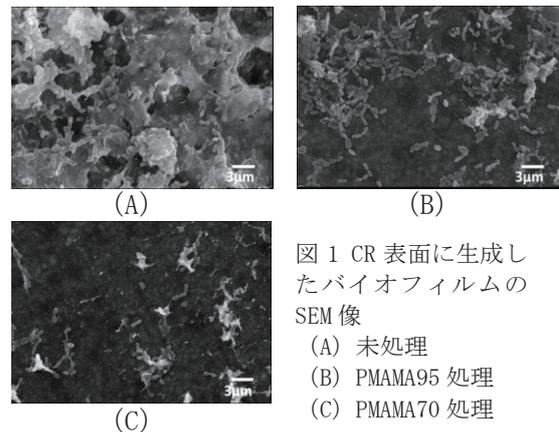


図1 CR表面に生成したバイオフィームのSEM像

(A) 未処理
(B) PMAMA95処理
(C) PMAMA70処理

In situ prevention of bacterial infection of dental composite resin using MPC polymers and evaluation of its physical durability

Jun Koyama^{1,2}, Kyoko Fukazawa², Yuuki Inoue², Kazuhiko Ishihara², Yoshiyuki Mori¹

¹Department of Dentistry, Oral and Maxillofacial Surgery, Jichi Medical University

²Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo

Tel: +81-285-58-7390, Fax: +81-285-44-8669, E-mail: koyama@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

マイクロファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイト顆粒の作製およびその骨再建への応用

¹徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔外科学分野,²福岡歯科大学学生体工学分野,³九州大学歯学研究院生体材料学分野

○ 秋田 和也¹, 福田 直志¹, 大江 剛¹, 真野 隆充¹, 都留 寛治², 石川 邦夫³, 宮本 洋二¹

【緒言】われわれは生体内で吸収されて骨置換する炭酸アパタイト(CO₃Ap)顆粒を開発し、新規骨補填材料として 2017 年に薬事承認を得た。本品は 2018 年より市販されているが、この顆粒は緻密体であるため、さらなる迅速な骨置換を目指し、現在改良を行っている。今回マイクロファイバーを混入した石膏を前駆体とし、溶解-析出反応により組成変換を行うことで、種々の気孔径を有する多孔質 CO₃Ap 顆粒を作製し、その物理学的特性を検討した。さらにウサギ頭蓋骨へ埋入し組織学的検討を行ったので、併せて報告する。

【実験】半水石膏とマイクロファイバー(ファイバー径;50、120、205 μm)を、マイクロファイバーの重量比が 10 wt% となるように混合し、混水比 0.2 で練和後、冷間等方圧加圧法により 50 MPa の圧力下で硬化させた。硬化後、700°C(昇温速度 0.13°C/分)で 5 時間焼成することによってファイバーを除去し、これを前駆体とした。その後、顆粒径が 1.0 ~ 1.4 mm となるように粉碎、分粒し、炭酸ナトリウム水溶液およびリン酸水素ナトリウム水溶液に浸漬し、CO₃Ap へ組成変換を行った。変換前後における形態学的観察は走査型電子顕微鏡を用いて行い、組成分析に関しては X 線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いて行った。次いで、日本白色ウサギ頭蓋骨に φ8 mm の骨欠損を作製し、緻密体 CO₃Ap 顆粒、気孔径:50、120、205 μm の多孔質 CO₃Ap 顆粒を埋入した。埋入後 2、4、8 週経過後に摘出し、研磨標本を作製して、骨欠損部の骨新生について組織学的評価を行った。

【結果と考察】前駆体である硫酸カルシウムは炭酸ナトリウム水溶液に 7 日間浸漬することで炭酸カルシウムに組成変換し、これをリン酸水素ナトリウム水溶液に 14 日間浸漬することで CO₃Ap へ組成変換した。気孔径の違いによる変換速度に差は認めなかった。また、CO₃Ap へ変換後も前駆体で形成した気孔径は維持されていた。研磨標本による観察では、多孔質 CO₃Ap 顆粒は緻密体同様優れた骨伝導性を示し、埋入後 2 週で気孔内部にも新生骨を認めた。なお、気孔内部における新生骨量は、気孔径 120 μm の多孔質 CO₃Ap 顆粒群で多い傾向にあった。以上の結果より、ファイバー含有石膏を焼成し、これを前駆体として組成変換を行うことにより、種々の気孔径を有する多孔質 CO₃Ap 顆粒の調整に成功し、さらに気孔内部における骨新生も確認した。以上より、多孔質 CO₃Ap 顆粒による迅速な骨置換の可能性が示唆された。

Fabrication of porous CO₃Ap granules using micro fiber and application for bone reconstruction

Akita KAZUYA¹, Fukuda NAOYUKI¹, Ohe GO¹, Mano TAKAMITSU¹, Tsuru KANJI², Ishikawa KUNIO³ and Miyamoto YOUJI¹

¹Department of Oral Surgery, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, ²Section of Bioengineering, Fukuoka Dental College, ³Department of Biomaterials, Faculty of Dental science, Kyushu University

Tel: +81-88-633-7354, Fax: +81-88-633-7462, E-mail: c301551016@tokushima-u.ac.jp

PLA ケージで被覆した OCP/CoI の垂直的骨増生

¹東北大学大学院 医工学研究科 骨再生医工学分野
○柳沢 俊樹¹, 安田 彩人¹, 鎌倉 慎治¹

【緒言】

オクタカルシウムフォスフェイト (OCP)・コラーゲン複合体 (OCP/CoI) は優れた骨再生能と生体吸収性を有する骨再生材料であり、歯科口腔外科領域の骨欠損を対象に 2018 年度の製品化を目指している。しかしながら、過去の研究からスポンジ状の OCP/CoI 単独では確実な垂直的骨増生は実現できず、他の人工材料を用いた外力緩和によって、それらを亢進することが報告されている。また一方では、生体に埋入する直前の OCP/CoI に副甲状腺ホルモン(PTH)を滴下することで骨再生能が向上することが報告されている。そこで本研究では OCP/CoI に PTH を滴下したものに、外力緩和のためにポリ乳酸 (PLA) ケージを併用したものを、ラット頭蓋冠上の骨膜下に埋入し、より確実な骨増生が可能かどうかを検討した。併せて PLA ケージの形状と骨増生の関連性の有無について検討を加えた。

【実験】

過去の報告の通り、湿式合成法にて作製した OCP とアテロコラーゲンを複合化させ、OCP/CoI ディスク (直径 9mm, 高さ 1.5mm) を作製した。また、OCP/CoI ディスクの上面及び側面を覆う形のポリ乳酸 (PLA) ケージ (外径 10 mm, 内径 9 mm, 高さ 2.5mm) を作製した。それらケージは、骨膜側の細胞接触を考慮し N 群 (無孔), B 群 (骨膜側に 6mm φ の孔), S 群 (骨膜側に 1mm φ の孔を 7 個) の 3 種類とした。PLA ケージ内に OCP/CoI を填入し、さらに PTH 溶液 1.0μg を OCP/CoI に滴下したものを埋植試料とした。埋植試料はラット頭蓋冠上の骨膜下に埋入直前に調整し、PLA ケージに被覆されていない OCP/CoI ディスクの下面が頭蓋冠の骨面に接触するように設置した。埋入 4 週間及び 12 週後にマイクロ CT 撮影を行い、12 週後に標本を採取し、脱灰標本を前頭断で薄切し HE 染色した標本を用いて組織学的観察および組織定量学的解析を行った。組織定量学的解析は、埋入した OCP/CoI を 4 領域に等分割 (既存骨側中央部 (LC), 既存骨側辺縁部 (LM), 骨膜側中央部 (UC), 骨膜側辺縁部 (UM)) し、N 群, B 群および S 群それぞれについて各領域の再生骨率を計測した。

【結果と考察】

マイクロ CT 撮影の結果、N 群, B 群, S 群ともに既存骨側および PLA ケージ内縁において放射線不透過性が時間経過とともに亢進していた。また、B 群と S 群では、それぞれ PLA ケージに形成されている孔周辺に透過像が多かった。組織学的観察の結果、N 群, B 群, S 群ともに既存骨側と PLA ケージ内縁において新生骨形成量が多かった。また、B 群と S 群では、骨膜側における PLA ケージの孔から線維組織が侵入したため、孔周辺の新生骨形成量が少なかった。その他、骨膜周辺には新生骨は形成されていなかった。組織定量学的解析の結果、再生骨率は、S 群, N 群, B 群の順で高く、各領域での再生骨率はいずれも LM, UM, LC, UC の順で高かった。また、B 群と S 群では、PLLA ケージに形成された孔がある領域において、孔が形成されていない N 群では生じなかった有意差が生じた。

以上の結果より、PLA ケージで被覆した OCP/CoI の骨増生は骨膜側の細胞接触の有無に関わらず、既存骨側を起点に起こること、PLA ケージ内縁に形成されること、またより確実な骨増生には広範な骨膜側の細胞接触が必ずしも有効に作用しない可能性が示唆された。

Vertical bone augmentation of octacalcium phosphate and collagen composites covered by poly lactic acid cage

Toshiki Yanagisawa¹, Ayato Yasuda¹, Shinji Kamakura¹

¹Bone Regenerative Engineering Laboratory, Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University
Tel: +81-22-717-8235, Fax: +81-22-717-8235, E-mail: toshiki.yanagisawa.q8@dc.tohoku.ac.jp

免疫原性細胞死を活用するためのがん光熱免疫療法用アジュバント

¹早稲田大学理工学術院, ²産業技術総合研究所 健康工学研究部門
○橋本 薫¹, 王 秀鵬², 安永 茉由², 山崎 淳司¹, 伊藤 敦夫²

【緒言】光熱療法は腫瘍細胞死をもたらすが、細胞死に伴う腫瘍抗原や DAMP の抗腫瘍免疫への活用が十分ではない。一方、がん免疫療法用のアジュバントは、抗腫瘍免疫に寄与するが、それ自身で腫瘍細胞死を起こすことはない。本研究では、アジュバントに光熱機能を付加して、腫瘍細胞死を誘導し、併せて細胞死に伴う腫瘍抗原や DAMP を活用して抗腫瘍免疫を活性化させる新しいメソポーラスシリカアジュバントの創製を試みた。

【実験】界面活性剤を 70°C の純水に溶解し、攪拌しながらテトラエトキシシランを加え、白色沈殿物ができるまで攪拌を続けた。その後、遠心分離で沈殿物を回収し、純水とエタノールで洗浄後、数日間室温乾燥した。さらに 80°C で乾燥後、空気もしくはアルゴン雰囲気にて 550°C で焼成を行い、それぞれメソポーラスシリカ (MS) および炭素を含有するメソポーラスシリカ (C-MS) を得た。また、純水に溶解した 0.2M のグルコースを 180°C で水熱処理して得られた炭素ナノ球に対して、上記と同様の操作をし、アルゴン雰囲気中で焼成することで、炭素ナノ球を核としたメソポーラスシリカ (C@MS) を得た。これら 3 種類のメソポーラスシリカはそれぞれ粉末 X 線回折 (XRD)、SEM、TEM、赤外分光法 (FT-IR)、有機元素分析 (CHN) で評価した。さらに、超純水中に分散した各試料に対して近赤外線レーザーを 2W/cm² で 5 分間照射して温度応答性を評価し、LLC 細胞培養系に添加することで細胞毒性を調べた。続いて細胞毒性の少ない範囲で試料を添加した LLC 細胞に対して、6W/cm² で 5 分間近赤外線レーザー照射を行い、各試料が光熱療法用材料として有用であるか調べた。その後 C@MS を添加した細胞について、照射から一定時間後の細胞生存率と免疫原性細胞死のマーカーの一つである細胞外表出 ATP 量を測定した。

【結果と考察】3 種類のシリカ試料は、XRD 測定により非晶質であること、FT-IR 測定により Si-O-Si 構造を持つことが示唆された。SEM と TEM 観察によりシリカが球状構造を有し、細孔が中心から外殻に向かって伸びていることが確認された。また、MS と C-MS 試料の粒径は約 100nm であり、C@MS 試料の粒径は約 400nm であった。CHN 分析により、MS、C-MS、C@MS の炭素含有量はそれぞれ 0.24、3.45、39.3wt% であった。近赤外線を照射すると C@MS 及び C-MS を分散した純水の温度はそれぞれ 65.5°C、42.5°C まで上昇したが、MS では温度上昇が確認されなかったことから、炭素が近赤外線に応答して温度上昇することが示唆された。温熱療法に適切な温度は 44~46°C であるため、C@MS は十分な発熱性能があると考えられた。C@MS は 100µg/mL 以上で細胞毒性を示したが、MS と C-MS は 200µg/mL まで細胞毒性を示さなかった。細胞毒性の少ない試料濃度 25µg/mL で近赤外線照射を行うと、発熱による細胞死と細胞外表出 ATP が確認され、光熱免疫療法用材料としての有効性が認められた。細胞外表出 ATP 量比は、近赤外線照射から 6 時間後に最大となった。一方、レーザー照射のみや試料添加のみのサンプルでは ATP 量比に大きな変化は見られなかった。したがって、C@MS は、細胞毒性を示さない濃度範囲において使用すれば、近赤外線レーザー照射により、細胞死と ATP の細胞外表出を起こし、がん光熱免疫療法用ナノ材料として有用であることが示唆された。

【謝辞】本研究の一部は科研費 (16H05387, 17K01399) で実施された。

Adjuvant for cancer photothermal-immunotherapy to utilize immunogenic cell death

Kaoru Hashimoto¹, Xiupeng Wang², Mayu Yasunaga², Atsushi Yamazaki¹, Atsuo Ito²

¹Faculty of Science and engineering, Waseda University ²Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

E-mail: s-f.welkin@fuji.waseda.jp

免疫賦活剤担持水酸アパタイトセラミックスの作製と免疫細胞応答性

¹ 明治大学大学院理工学研究科応用化学専攻

² 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子免疫学分野

○加々見 早苗¹, 木造 理萌子¹, 永井 重徳², 相澤 守¹

【緒言】

近年、がん治療では副作用の少ない免疫療法が注目されている。我々はこれまでに超音波噴霧熱分解法により表面にナノ気孔を備えたリン酸カルシウム微小球 (CPMs) を合成し、血管新生抑制剤を担持させた CPMs を用いて薬物送達システムに基づいた、新しい化学塞栓療法を提案している[1]。本研究は、その CPMs に免疫賦活剤 (抗 CD3 抗体、コンカナバリン A (Con A)) を担持させ、化学塞栓療法と免疫療法を組み合わせ、新規な免疫療法を確立することを目的としている。今回は、その予備的検討として、水酸アパタイト (HAp) 粉体あるいはセラミックスに免疫賦活剤を担持させ、それらの徐放特性および免疫細胞応答性を調査したので報告する。

【実験】

HAp-100 粉体 (太平化学) ~0.01 g に対し、免疫賦活剤溶液 1.5 cm³ を加え、マイクロチューブ内で 25 °C, 48 h 振とうすることで免疫賦活剤を担持した。その後、各免疫賦活剤担持 HAp 粉体 ~0.01 g を 0.5 cm³ のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) (pH 7.4) および酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に浸漬し、37 °C, 7 日間振とうすることで免疫賦活剤の徐放特性を調査した。

次いで、免疫賦活剤を担持した HAp セラミックスへのマウス脾臓細胞応答性を調査した。HAp-100 粉体 ~1.0 g を 50 MPa で一軸加圧成形し、1200 °C, 5 h 焼成することにより HAp セラミックス (直径 ~15 mm, 厚さ ~2.0 mm) を作製した。その後、鏡面研磨と乾熱滅菌を行ない、得られた HAp セラミックスを濃度 1500 ppm の Con A 溶液に 48 h, 5 ppm の抗 CD3 抗体溶液に 24 h 浸漬させることで免疫賦活剤担持 HAp セラミックスを得た。同様の条件で細胞培養用ポリスチレンプレートにも各免疫賦活剤を担持させ、これらを比較することで HAp の有用性を調査した。担持後、C57BL/6N マウス由来脾臓細胞を播種し、培養 1 日後、フローサイトメーターを用いて活性化免疫細胞 (CD69 陽性細胞) の割合を算出した。さらに、培養 1, 3 日後には細胞数のカウントと走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察も行なった。

【結果と考察】

薬剤徐放実験では、どちらの薬剤も酸性条件下の方が中性条件下よりも多くの薬剤を放出した。サイトグラムの解析結果より、セラミックスおよびポリスチレンプレートのいずれにおいても、薬剤を担持させることで活性化免疫細胞の割合は増加した。また、いずれの薬剤もポリスチレンプレートに担持させた場合より HAp セラミックスに担持させた方が活性化免疫細胞の割合は高くなったが、細胞数においてはポリスチレンプレートと HAp セラミックスで有意な差は観察されなかった。このことから、HAp と免疫賦活剤とを組み合わせると、活性化している免疫細胞の数が増加していると考えられ、免疫賦活剤のキャリアとしての HAp の有効性が示唆された。今回調査した範囲では、抗 CD3 抗体と HAp セラミックスを組み合わせるとき、活性化免疫細胞の割合が最も高かった。また、SEM による観察結果から、球状の細胞が基材上に存在し、変形、肥大化している様子が観察された。これらの結果から、免疫賦活剤を HAp に担持させることは、免疫系に積極的に働きかける材料創製に有用であると期待できる。

[1] M. Aizawa, M. Honda, M. Emoto, ACS SYMPOSIUM SERIES 1253 (2017) 107-121.

Fabrication of Hydroxyapatite Ceramics Loaded with Immunostimulators and Their Responses of Immune Cells

Sanae Kagami¹, Rihoko Kizukuri¹, Shigenori Nagai², Mamoru Aizawa¹

¹Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

²Department of Molecular Immunology, Graduate School of Medical and Dental Sciences

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

生分解性インジェクタブルポリマーを用いた抗原・アジュバント徐放による免疫増強

¹ 関西大 ORDIST, ² 関西大化学生命工, ³ 関西大医工薬連携研究センター

○能崎優太¹, 葛谷明紀^{2,3}, 大矢裕一^{2,3}

【緒言】

免疫系を人為的に制御することにより、感染症予防やがん治療を達成する試みが行われている。免疫を制御するための薬剤はワクチンと呼ばれ、抗原と免疫を賦活する物質(アジュバント)から構成される。ワクチンによる免疫獲得の効率化のため、抗原の標的細胞への送達、抗原の持続的な供給(徐放)や投与の簡便性向上といった特性が求められており、ヒドロゲルなどのマトリックスからの徐放が一つの解決手段であると考えられる。一方、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、薬や細胞などを溶解・懸濁することができるため、ドラッグデリバリーシステムや組織再生用足場材料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、それらの医療応用について報告してきた¹⁾。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。tri-PCG の末端にスクシンイミド(OSu)基を導入した tri-PCG-OSu と tri-PCG の混合ミセル水溶液に水溶性ポリアミンであるポリリシン(PLys)を混合することで、温度に応答してゲル化する際に、OSu 基とアミノ基が反応してアミド結合を形成し、化学架橋を持つヒドロゲルを調製できることを明らかにした²⁾。本研究では、不可逆的なゲル化を示す IP システムを用いて抗原とアジュバントを徐放可能な IP システムの開発を目的とした。モデル抗原として卵白由来オボアルブミン(OVA)を使用し、アジュバントとしては、免疫担当細胞の Toll-like 受容体 9 を刺激することが知られているオリゴヌクレオチド、CpG-DNA を用いた。

【実験】

ローダミンでラベル化した OVA と FITC でラベル化した CpG-DNA を所定量含む PBS 溶液と tri-PCG, tri-PCG-Acryl, PLys(MW: 94600)の PBS 溶液を 37°C に加温することでゲル化させた。ゲル上部に PBS を加えて 37°C で所定時間インキュベーションして上澄みの PBS を回収し、放出された OVA と CpG-DNA の蛍光をモニターすることで放出挙動を評価した。

【結果と考察】

tri-PCG のみから構成される IP ヒドロゲルからは、インキュベーション開始 3 日後で 100% の CpG-DNA がリリースされた。tri-PCG に PLys を加えると CpG-DNA のリリースは、tri-PCG のみのゲルと比べて著しく遅くなることが分かった。これは、IP 溶液中で CpG-DNA のリン酸エステル基と PLys のアミノ基が静電相互作用し、ポリイオンコンプレックスを形成して、見かけの分子量が増加したためであると考えられる。また tri-PCG-OSu を混合すると CpG-DNA のリリースは、tri-PCG-OSu を混合しない系に比べてさらに遅くなった。OVA のリリースについても PLys, tri-PCG-OSu を混合した系で遅くなることが分かった。以上より、抗原やアジュバントのリリース挙動をコントロールできるデリバリーシステムを構築することができた。

【参考文献】

- 1) Y. Ohya *et al.*, *Polym. J.*, **2014**, *46*, 632-635.
- 2) Y. Ohya *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2017**, *3*, 56-67.

Preparation of Sustained Release Antigen and Adjuvant Delivery System Using Temperature-responsive Biodegradable Injectable Polymers

Yuta YOSHIZAKI¹, Akinori KUZUYA^{2,3}, Yuichi OHYA^{2,3}, (¹ORDIST, Kansai University, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan, ²Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, ³CEMP, Kansai University) Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

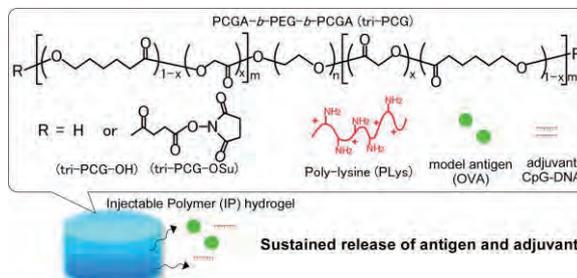


Fig. 1. Design of sustained releasing system for antigen and adjuvant using IP hydrogel exhibiting irreversible gelation.

BNCT への応用を目指したボロン酸結合ポリマーミセルの調製

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大 ORDIST, ³ 関西大医工薬連携研究セ, ⁴ 大阪医大
 ○梅山諒也¹・能崎優太²・宮武伸一⁴・葛谷明紀^{1,2,3}・大矢裕一^{1,2,3}

【緒言】近年, 身体への負担の少ないがん治療法としてホウ素中性子補足療法 (BNCT) が注目されている¹⁾。BNCT とはホウ素化合物を腫瘍細胞に選択的に取り込ませ, 体外から低エネルギーの熱中性子線を照射し, その際に生じるホウ素と熱中性子との核分裂 (α 線と ${}^7\text{Li}$ 粒子の放出) を利用して腫瘍細胞を選択的に破壊する放射線療法の一つである。従来の放射線 (X 線) 療法では, 正常細胞にも影響を与えてしまうが, BNCT で放出される α 線と ${}^7\text{Li}$ 粒子は短い距離で消滅し, 細胞一個分程度にしか影響を与えず, 選択的にホウ素化合物を集積できさえすれば, 腫瘍細胞のみを死滅させることが可能であると考えられている。現在, BNCT 用のホウ素薬剤として, フェニルアラニンのパラ位にボロン酸が結合した *p*-boronophenylalanine (BPA) を用いた治験が行われている。BPA はアミノ酸代謝が亢進している腫瘍細胞に比較的取り込まれやすいという特徴を持っているが, 体外排泄が早いので, 有効濃度の BPA を腫瘍細胞に送達させるためには大量投与が必要であり, 腫瘍集積性を高めるためのドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が望まれている。本研究では, ナノ粒子が EPR (Enhanced Permeation and Retention) 効果などにより腫瘍に集積する可能性が高まることに着目し, 多数のホウ素原子を含むナノ粒子を調製し, BNCT に利用することを考えた。フェニルボロン酸 (PBA) と 1,2-ジオールはボロン酸エステルを形成することが知られている。そこで, 1,2-ジオール基を持つモノマーとして *N*-2,3-ジヒドロキシプロピルアクリルアミド (DHPA) を設計し, これと血中滞留性の向上を意図してポリエチレングリコール (PEG) を導入したジブロック共重合体 PDHPA-*b*-PEG を設計・合成した。この共重合体の PDHPA 側鎖のジオールが PBA と結合すると疎水性となり, 両親媒性構造をとるため, 水溶液中で PBA との結合により高分子ミセルを形成すると期待される (Fig. 1)。

【実験・結果】DHPA の合成は 3-アミノ 1,2-プロパンジオールと塩化アクリロイルのカップリング反応により行った²⁾。次に, PEG が結合した連鎖移動剤を用いて, DHPA の可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合を行い, ジブロック共重合体 (PEG-*b*-PDHPA) を合成した。得られたポリマーをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で PBA と混合し, 動的散乱 (DLS) や透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行ったところ, 粒子径約 100~250 nm の高分子ミセル様会合体の形成が確認できた。また調製した会合体を凍結乾燥した後, 有機溶媒に溶解させ, ${}^1\text{H-NMR}$ を測定したところ, PEG-*b*-PDHPA 一分子あたりホウ素濃度 0.98wt% であった。さらに, ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry) を用いたホウ素元素分析を行ったところ, ホウ素濃度は 1.05wt% であり, ${}^1\text{H-NMR}$ 結果と矛盾しない数値が得られた。

【参考文献】

- 1) T. Yamamoto *et al.*, *Cancer Lett.*, **2008**, 262, 143-152.
- 2) Y. Zou *et al.*, *Biomacromolecules.*, **2010**, 11, 284-293.

Preparation of boronic acid binding polymer micelles for BNCT.

Ryoya UMEYAMA¹, Yuta YOSHIKAWA², Shin-ichi MIYATAKE⁴, Akinori KUZUYA^{1,2,3}, Yuichi OHYA^{1,2,3}
 (¹Faculty of Chem. Mater. & Bioeng, Kansai Univ., ²ORDIST, Kansai Univ., ³CEMP, Kansai Univ., ⁴Osaka Medical College, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan)

¹Tel: +06-6368-0818, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

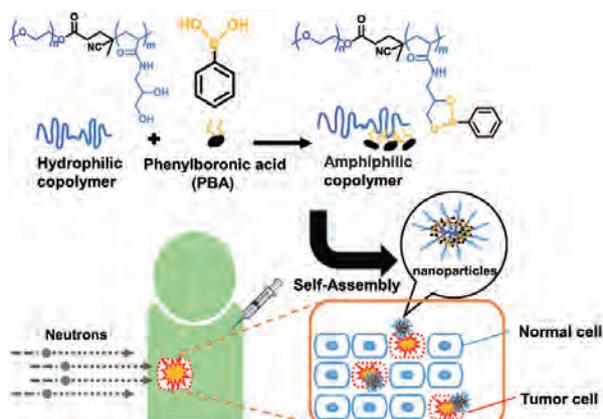


Figure 1. Schematic illustration for BNCT using boronic acid-binding block polymer micelle.

細胞膜破壊能を有するアニオン性ジブロック共重合体 からなる高分子ミセルの機能

東理大院基礎工¹・Univ. Wisconsin²

○後藤健¹・小松周平¹・石原量¹・Glen S. Kwon²・菊池明彦¹

【緒言】薬物治療における副作用を低減し、効果的な治療を達成するため、ドラッグデリバリーシステム (DDS) が検討されている^[1]。DDS キャリアの一つとしてポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルが提案されている^{[2],[3]}。PIC ミセルは遺伝子やタンパク質などの電荷を有する薬物を担持可能であり、構成成分に弱イオン性高分子を用いると pH 変化にともなう電荷密度の変化に応答し、PIC を解消し薬物放出すると考えられる。一方、DDS キャリアはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるため、エンドソームからの離脱が効果的な治療に重要である。そこで本研究では、PIC ミセルの構成成分としてポリ(エチルアクリル酸) (PEAA) に着目した。PEAA の酸解離定数 (pKa) は 6.2^[4] であり、細胞外 pH 7.4 から後期エンドソーム内 pH 5.4 への pH 変化に伴い、PIC を解消するとともに、プロトン化した PEAA はリソソームのリン脂質膜と水素結合形成に起因する相互作用が生起し、膜破壊することが知られており^[5] (Fig. 1), 細胞質内への薬物輸送が期待できる。そこで本研究は、PEAA とポリ(エチレングリコール) (PEG) からなる pH 応答性ブロックコポリマー (PEG-*b*-PEAA) を用い、PEAA の pH 応答性と膜破壊能を明らかにすることを目的とした。

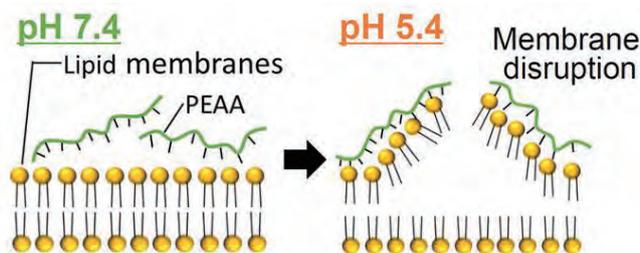


Fig. 1 Mechanisms for membrane disruption by PEAA.

【実験】既報^[6]に従い合成した PEG 修飾マクロ連鎖移動剤存在下、EAA の可逆的付加-開裂連鎖移動重合を行い、PEG-*b*-PEAA を合成した。膜破壊能はリン酸緩衝液 (PB) (pH 7.4, 5.4) 中のリポソームに PEG-*b*-PEAA を加えリポソームの残存数から評価した。次に、poly(2-Dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA)^[7] と、PEG-*b*-PEAA からと PB 中で PIC ミセルを調製し、アニオン/カチオン比を変化させた PIC ミセルの物性を解析した。

【結果と考察】合成した PEG-*b*-PEAA の酸塩基滴定から、PEG-*b*-PEAA の pKa は 6.3 であり、細胞外 (pH 7.4) から後期エンドソーム内 (pH 5.4) への pH 範囲内で pH 応答性を示すことを明らかにした。pH 7.4 と 5.4 の Rhodamine B 内包リポソーム水溶液に FITC ラベル化 PEG-*b*-PEAA を加えたところ pH 7.4 では PEG-*b*-PEAA の緑色蛍光が確認できなかったものの、pH 5.4 ではリポソームの赤色蛍光 (Fig. 2b) と PEG-*b*-PEAA の緑色蛍光 (Fig. 2c) が重なり、リポソーム表面に PEG-*b*-PEAA が吸着していることがわかった (Fig. 2d)。pH 変化にともなう PEG-*b*-PEAA と接触したリポソームの残存率の変化を観察したところ、pH 5.4 でのみリポソーム残存率が減少した。pH 7.4 においては、脱プロトン化した PEAA はリン脂質と相互作用しないのに対し、pH 5.4 で PEG-*b*-PEAA のカルボキシ基がプロトン化し、このカルボキシ基がリポソームのリン脂質膜と水素結合した結果^[5]、膜破壊が生じたと考えられた。以上より、PEG-*b*-PEAA を用いて調製した PIC ミセルは、細胞外 pH から後期エンドソーム内 pH への変化に応じて崩壊し、膜破壊能による高効率な薬物輸送可能な DDS キャリアになり得ることが期待できる。

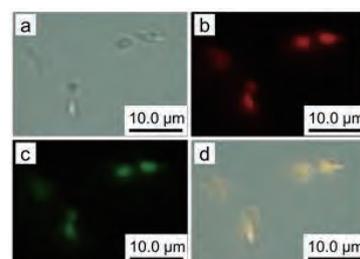


Fig. 2 Fluorescent images of liposomes containing Rhodamine B in pH 5.4. (PEG-*b*-PEAA conc. 1.0×10^{-3} wt% Exposure time 1/3 sec. a) Phase-contrast, b) Rhodamine B, c) FITC, d) merged.

【参考文献】[1] G. Housman, P. R. Cullis, *Cancer*, **2014**, 6, 1769-1792. [2] A. Harada, K. Kataoka, *Macromolecules*, **1995**, 28, 5294-5299. [3] M. Oishi, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1624-1625. [4] M. Sedláček, *Colloid Polym. Sci.*, **2017**, 295, 1281-1292. [5] J. L. Thomas, D. A. Tirrell, *Acc. Chem. Res.*, **1992**, 25, 336-342. [6] A. J. Convertine, *et al.*, *J. Control. Rel.*, **2009**, 133, 221-229. 1406. [7] M. Sahnoun, *et al.*, *Polym. Sci.*, **2005**, 43, 3551-3565.

Functional analyses of pH-responsive polyion complex micelles made from diblock copolymer having pH-dependent lipid membrane destructivity

Ken Gotoh¹, Syuuhei Komatsu¹, Ryo Ishihara¹, Glen S. Kwon², Akihiko Kikuchi¹

(¹Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., 6-3-1 Niijuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan. ²Sch. Pharm., Univ. of Wisconsin, USA) ¹Tel: +813-5876-1415, FAX: +813-5876-1639, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

リガンド導入数制御を目指した γ -シクロデキストリン誘導体の分子設計

¹神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻
○杉浦 幸作¹, 大谷 亨¹

【緒言】中性子捕捉療法(BNCT)は、熱中性子によるホウ素元素の核分裂を利用してがん細胞を破壊する治療法であり、周囲の正常細胞への影響が少ないことから副作用の少ないがん治療法として注目されている。しかし、BNCT 用に開発されているホウ素化合物では、化合物中のホウ素の含有率が低く大量に投与する必要があり、腫瘍組織への選択的送達性が低い問題点がある。このことから、ホウ素化合物を集積化し腫瘍組織に選択的に送達するホウ素デリバリーシステムの開発が必要となる。本研究では、ホウ素化合物として臭素化 Dodecaborate ($[B_{12}X_{12}]^2(X=Br)$) に着目した。Dodecaborate は正二十面体構造をとる 2 価の無機アニオンで、1 分子中に 12 個ものホウ素元素を有するため BNCT への応用が期待されているが、単独ではがん指向性を持たない。そこでわれわれは、シクロデキストリン(CD)の豊富な化学修飾性を利用してがん指向性を付与するとともに、取り込み効率に影響すると考えられるリガンド導入数の制御を試みた。具体的には、葉酸 (FA) もしくはビオチンをモデルリガンドとして利用し、 γ CD 1 分子へのリガンド導入数を増加させるため、既に能動的ターゲティング能を向上することが知られている hyperbranched polyglycerol (HPG)¹⁾を CD に修飾した HPG-g- γ CD を調製した。

【実験】無水 DMSO に γ -CD を溶解し、NaH, 15-crown-ether 存在下、グリシドールを滴下することでアニオン開環重合を行い、透析により HPG-g- γ CD を精製した。合成の確認と、得られた HPG-g- γ -CD の分岐度、末端 1,2-diol 数を算出するため、¹H-NMR, ¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS 測定を行った。さらに、FA にボロン酸を修飾した葉酸ボロン酸 (FBA) と HPG-g- γ CD を混合し、FA 修飾を行った。

【結果と考察】HPG-g- γ CD の分子量は約 4000,7000 の 2 種を調製した。¹³C-NMR (IG) 測定から、枝分かれ構造中の末端の 1,2-diol 数の割合をそれぞれ 43, 53%となった。その結果、末端 1,2-diol 数はそれぞれ 16, 41 となり γ CD が有する 8 と比較して約 2 倍,5 倍に増加したことが確認された。現在これら HPG-g γ CD に修飾する FBA の導入数を制御する条件の探索を行っており、当日は、これらの結果に加えて、合成した FBA 修飾 HPG-g γ CD の細胞内取り込み試験の結果についても報告する予定である。HPG-g- γ CD は Dodecaborate ($[B_{12}Br_{12}]^2$) を高い結合定数 ($6.07 \times 10^5 M^{-1}$) にて包接することを確認しており (Fig. 1)、BNCT への応用展開が期待される。

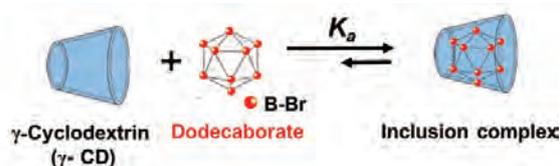


Fig. 1. Inclusion complexation between HPG-g- γ CD and a dodecaborate

【参考文献】 1) M. Calderón *et al.*, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, 9, 92-99.

Molecular Design of γ -Cyclodextrin Derivatives for Modulation of The Number of Ligands

Kousaku Sugiura¹, Tooru Ooya¹

¹ Department of Chemical Science and Engineering, Kobe University, Kobe, Japan

Tel: +81-78-803-6255, Fax: +81-78-803-6255, E-mail: ooya@tiger.kobe-u.ac.

ポリエチレングリコール修飾ヒアルロン酸のミクロ相分離現象に基づいたタンパク質保持

¹神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻
○小田和音¹, 安富 諒¹, 大谷 亨¹

【緒言】異なる二種の水溶性高分子による液-液二相分離系にタンパク質などの基質を加えると、一方の相に優先的に分配される。この水性二相分配現象は系が水により形成され基質に対し比較的温和な条件なため、タンパク質の変性・失活の防止が期待されており、これを利用したタンパク質分離システムは数多く報告されてきた。とりわけ、ポリエチレングリコール(PEG)水溶液とヒアルロン酸(HA)水溶液による水性二層分離現象を利用し、HAにPEGを化学修飾したPEG-*graft*-HAのDDS材料への応用は、長期徐放の観点から興味深い¹⁾。しかしながら、PEG相に分配されたインシュリンの放出制御が行なわれているものの、タンパク質に応じた放出制御の条件は確立されていない。そこで本研究では、タンパク質の分配に影響する要因として、PEG-*graft*-HA分子のPEG導入数、PEG分子量、及び得られたPEG-*graft*-HAの濃度に着目した。擬生体環境条件におけるPEG/HA二層分離濃度条件を相図作成から明らかにした。さらに、任意にPEG導入数を制御する方法を検討し、擬生体環境中でのPEG/HA相分離構造の解析、そして、いくつかのモデルタンパク質の分配・放出性に関する検討を行った。

【実験】PEG/HAのリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)中での相分離条件を確認するため、異なる濃度のPEG溶液とHA溶液の混合溶液500 μLを調製し、攪拌後、遠心分離を行い二相系の有無を確認した。二相形成が確認されなくなるまで上記の操作を繰り返し行い、相図を作成した。異なる分子量のPEGを用いて同様に相図を作成した。HAと片末端アミノ化PEG(PEG-NH₂)を純水中で種々の濃度で混合し、縮合剤としてDMT-MMを加え、PEG-*graft*-HA(Fig. 1)を得た。PEG-*graft*-HAのPEG導入率を示差走査熱量(DSC)測定から算出した。得られたPEG-*graft*-HAを12 mM PBS溶液に溶解し(4wt%), 600 nm波長光における透過率を測定からミクロ相分離状態を評価した。さらに、分子量の異なるPEGを用いて同様にPEG-*graft*-HAを調製した。

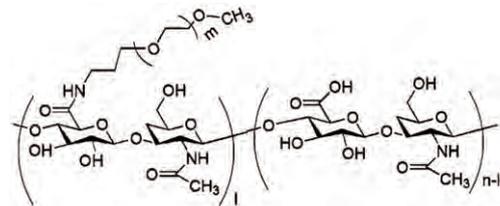


Fig.1 Chemical structure of PEG-*graft*-HA

【結果と考察】PEG/HAの相図を作成した結果、PEGの分子量の違いによって二層分離する濃度条件は変化した。分子量6000のPEGを用いたPEG-*graft*-HAのDSC測定の結果、PEGの導入率は5~60 wt%まで仕込み量を変化するのみで任意に制御可能であった。PEG-*graft*-HA含有PBS透過率は、PEG導入率が35 wt%までは1.5%であったが、これと同じPEG/HA濃度を溶解した混合溶液では、ほぼ100%であった(Fig. 2)。これはPEGのグラフト化によってPEGとHAがPBS中でミクロスケールでの相分離を誘発していることを示していた。一方、PEG導入率が60 wt%となると透過率が上昇していたことから、PEG-*graft*-HAのミクロ相分離は40%以下が望ましいと判断できる。現在、分子量の異なるPEGを導入したPEG-*graft*-HAを調製中であり、これらの相分離解析とモデルタンパク質としてインシュリン及び抗体を用いた放出試験を行う予定である。

【参考文献】

1) Moriyama, K.; Yui, N., *J. Controlled Release* **1996**, 42 (3), 237-248.

Protein Partition in Micro-Phase Separated Aqueous Solution Containing Poly(ethylene glycol)-*graft*-Hyaluronic acid

Kazune Oda¹, Ryo Adomi¹, Tooru Ooya¹

¹ Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University
Tel: +81-78-803-6255, Fax: +81-78-803-6255, E-mail: ooya@tiger.kobe-u.ac.jp

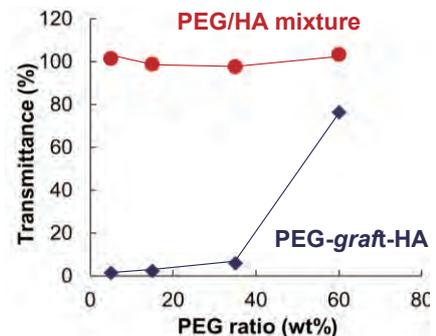


Fig.2 Transmittance change of PEG-*graft*-HA and PEG/HA mixture

経肺投与 DDS への応用を目指した新奇な多孔質 PLGA 粒子 ～肺送達特性の評価～

東京農工大学大学院 工学府応用化学専攻
○西村 真之介, 村上 義彦

【緒言】肺は、広い表面積を有し、肺胞腔内と毛細血管の距離が非常に近いという特徴を持つ。肺が有するこれらの特徴を、薬物の送達経路として利用する「経肺投与法」が注目されている。経肺投与法による薬物投与を実現するためには、高い肺送達能と肺内の免疫機構からの回避能を付与された薬物キャリアが必要である。本研究室は、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸からなる両親媒性高分子（PEG-*b*-PLA）が有する自己乳化特性を利用した「一段階のみの乳化」による新奇な粒子調製法を提案してきた^[1]。この新奇な調製法により得られる多孔質粒子は、経肺投与用の薬物キャリアとしての応用が期待できる。本発表では、本多孔質粒子の形態の制御方法の確立を検討し、肺送達能を評価した結果について報告する。

【実験方法】新奇な調製法^[1]によって、PEG-*b*-PLA の組成、および有機相に用いる有機溶媒種が異なる多孔質粒子を調製した。SEM および CLSM 観察によって、それらの調製条件が多孔質粒子の表面形態や内部構造に及ぼす影響を評価した。次に、乳化速度を調整することによって、5 あるいは 10 μm 程度の幾何学径を有する多孔質粒子の粉末を調製した。得られた粒子粉末をアンダーセンノンバーブルサンプラー（模擬肺）によって分級することにより、肺内の各部位における粒子沈着率を評価した。さらに、分級後の粒子の表面形態を SEM によって評価した。

【実験結果】PEG-*b*-PLA の組成、および有機溶媒種を変化させることによって、粒子の前駆体であるエマルションの安定性が変化し、カプセル状、あるいは蜂の巣状の内部構造を有する多孔質粒子が形成することが示唆された (Fig. 1)。また、肺送達能の評価に関しては、本多孔質粒子が肺の深部である気管支において高い沈着率を示した (Fig. 2)。分級後の粒子の形態観察においては、肺内の免疫機構を回避できると考えられる 3 μm 以上の粒径を有する多孔質粒子が、肺深部において多く沈着することが明らかとなった。以上の結果から、本多孔質粒子は、高い肺送達能、および肺内の免疫機構からの回避能を両立した薬物キャリアとして期待できる。

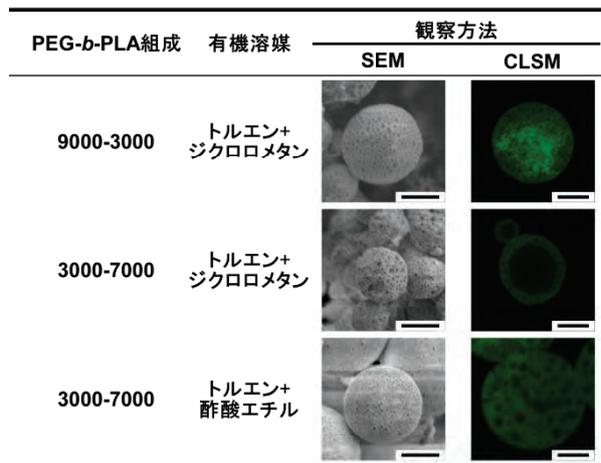


Fig. 1 PEG-*b*-PLAの組成および有機溶媒種が粒子の表面形態および内部構造に及ぼす影響 (Bar: 5 μm)

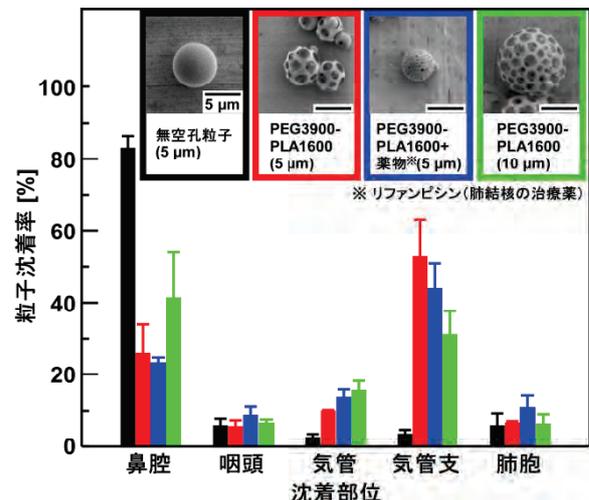


Fig. 2 呼吸器内における無空孔粒子および新奇多孔質粒子の沈着率

[1] Takami T., Murakami Y., *Langmuir*, 30, 3329-3336 (2014)

Development of Novel Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery –Evaluation of Pulmonary Delivery-

Shinnosuke NISHIMURA, Yoshihiko MURAKAMI (Development of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Tel/Fax: +81- 42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

細管による低侵襲な体内送達を可能とする多層構造型薬剤徐放シートの開発

¹東北大学大学院 工学研究科, ²東北大学大学院 医学系研究科
○佐藤 悠人¹, 永井 展裕², 西澤 松彦¹, 阿部 俊明², 梶 弘和¹

【緒言】従来の埋め込み型 DDS デバイスには患部に留めやすく、標的化した薬剤放出が出来るメリットがある一方で、薬剤の放出制御が困難であることや、切開・縫合が必要で患者への負担が大きいことなどが課題として挙げられている。そこで本研究では、薬剤の初期バーストを低減した長期徐放と細管からの射出による低侵襲な体内送達、体内送達後の自己展開を可能とする高分子シート型デバイスの開発を目指した。

【実験】高分子薄膜材料として Poly(ethylene glycol) dimethacrylate (PEGDM, Mw 750)、Tri(ethylene glycol) dimethacrylate (TEGDM, Mw 286.32)を用いた。PEGDM と TEGDM の比率を変えて光重合させることで、シート内の薬剤透過性を制御できる。PEGDM の比率が大きくなると透過性が高くなり、TEGDM の比率が大きくなると透過性が低くなる。はじめにモデル薬剤として蛍光色素 Fluorescein を含んだ薬剤層を作製した(図 1)。次に徐放に一方方向性を持たせるため、薬剤層の下に薬剤透過率の極めて低いガード層を設けた。また、薬剤層の上に徐放制御のための放出制御層を設けることで三層構造シートとした。更に、細管からデバイスを送達後に自己展開を可能とするため、ガード層の下側に四層目となる展開層の導入を検討した。まず、三層構造のシート型デバイスについて薬剤徐放特性を検証した。その後、三層構造及び四層構造シートについて理論と実験から自己展開性の検証を行った。また、インジェクターを用いて in vivo での射出試験も行った。



図 1 シート型薬剤徐放デバイスの構造

【結果と考察】薬剤層のみ(p40)では初期バーストが起きていたが、多層シート(p40p0, p20p40p0)では初期バーストが抑制され、約三カ月にわたって徐放の継続が確認された(図 2-A)。このことからガード層と放出制御層が、初期バーストを抑え、長期的な薬剤放出を可能としていることが分かった。薬剤徐放の方向性について調べた実験では、放出制御層側と比較してガード層側で薬剤の放出が有意に抑制されていた(図 2-B)。このことからガード層が徐放に一方方向性を付与していることが分かった。また、自己展開性についての実験では、展開のための四層目を設けることで自己展開が可能になるものと予想された。実際に四層シートを作製し展開試験を行った結果、展開し患部接着に適切な曲率の維持が確認できた。射出試験では、デバイスはインジェクターから射出され、ウサギの強膜上で展開し、眼球に密着している様子が確認された。

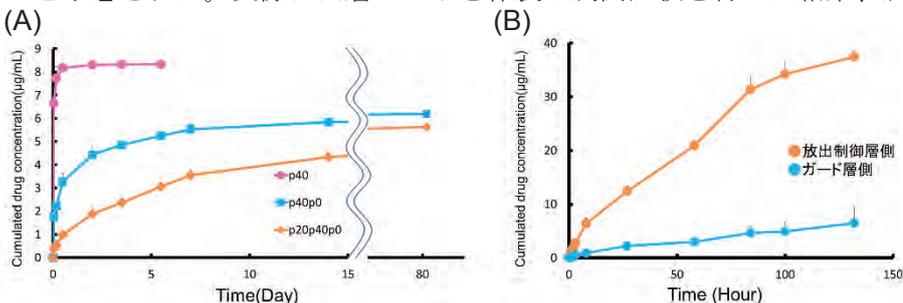


図 2 (A) 多層シートの薬剤徐放特性, (B) 片面徐放評価試験

Development of a multilayered drug release sheet that allows minimally invasive delivery into the body by needles

Yuto Sato¹, Nobuhiro Nagai², Matsuhiko Nishizawa¹, Toshiaki Abe², Hirokazu Kaji¹

¹Department of Finemechanics, Graduate School of Engineering, Tohoku University

²Division of Clinical Cell Therapy, United Centers for Advanced Research and Translational Medicine (ART), Graduate School of Medicine, Tohoku University

Tel: +81-22-795-4249, E-mail: y.sato@biomems.mech.tohoku.ac.jp

MPC を主鎖に用いることにより血中安定性向上を目指した PKC α 応答型遺伝子キャリアの開発

¹九大院工, ²九大未来化セ, ³九大分子 CMS, ⁴九大先端医療 IC
○杉野 竜成¹, 秀野 智大¹, 岸村 顕広^{1,2,3}, 森 健^{1,2}, 片山 佳樹^{1,2,3,4}

【緒言】 がんの治療法として、細胞毒性のある遺伝子を用いる遺伝子治療は有望視されているものの、腫瘍選択的な遺伝子発現をいかに達成するかが課題である。そこで我々は、がん細胞で特異的に異常活性化している酵素であるプロテインキナーゼ C α (PKC α)に着目し、PKC α に応答して遺伝子発現するキャリアを開発してきた。これまでに、直線状ポリエチレンイミン (LPEI) などの主鎖に PKC α の基質ペプチドをグラフトしたキャリアは、局所投与により、正常組織での遺伝子発現を抑制する一方、腫瘍選択的に遺伝子発現することを示した¹⁾。しかし、これまでのキャリアと遺伝子との複合体は、血中での安定性に乏しく、静脈投与に不向きであった。本研究では、血中での安定性の向上を目指し、キャリアの主鎖として、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) が利用可能であるかを検討した。MPC は細胞膜類似構造を有し、血液適合性に優れている。本研究では、MPC と PKC α の基質ペプチドのマクロモノマーを共重合することで、キャリアを合成し、複合体の遺伝子発現制御能と、血中安定性の向上の両立を目指した。

【実験】 PKC α の基質ペプチドのマクロモノマーを合成後、MPC とのラジカル重合により目的のポリマーを合成した (polymer S)。また、コントロールとして、PKC α によりリン酸化されないペプチドマクロモノマーを用いて重合したポリマーも合成した (polymer A)。また、ポリマーのペプチド導入率は ¹H-NMR から算出した。

各ポリマーをプラスミド DNA (pDNA) と複合体を形成させ、EtBr 追い出し法により DNA 凝縮能を評価した。また、複合体をマウス大腸がん細胞 CT-26 に添加し、遺伝子発現制御能を評価した。

【結果と考察】 ¹H-NMR より、polymer S および polymer A のペプチド導入率はいずれも 5.5 mol% であった。いずれのポリマーも、N/P 比=3 のときに、凝縮が飽和に達した。これまでの LPEI 主鎖のキャリアと比べて、凝縮能が低かった。また、N/P 比=1 の際の複合体のサイズは 228 nm と大きく、多分散度が大きいことから、緩い複合体を形成していることが示唆された。遺伝子発現能を調べた結果、対照として用いた LPEI に比べて遺伝子発現は非常に弱く、細胞内取り込みが起こりにくかったことが示唆された (Fig. 1)。そこで、複合体の強化を目的として、疎水基を導入したキャリアを開発した。当日は、改良型のキャリアについて、遺伝子発現制御能を報告する予定である。

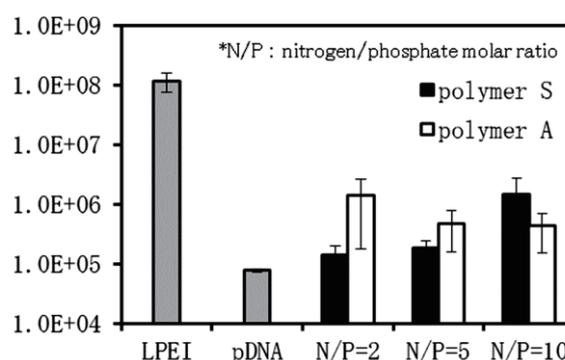


Fig.1 CT-26 を用いた遺伝子発現実験。

【引用文献】 1) R. Toita et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 15410-15417 (2012).

Improvement in the Blood Stability of PKC α -responsive Gene Carriers by Using 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC) as a main chain.

Ryusei Sugino¹, Tomohiro Shuno¹, Akihiro Kishimura^{1,2,3}, Takeshi Mori^{1,2}, Yoshiki Katayama^{1,2,3,4}

¹Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University, ²The Center for Future Chemistry, Kyushu University, ³International Research Center for Molecular Systems, Kyushu University, ⁴The Center for Advanced Medical Innovation, Kyushu University

Tel: +81-092-802-2851, Fax: +81-092-802-2851, E-mail: 3sl17016r@sls.kyushu-u.ac.jp

アシル化ポリロタキサンのナノ組織化挙動と疎水性薬物担体としての機能評価

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
○利根川 朝人, 田村 篤志, 由井 伸彦

【緒言】 ポリロタキサン(PRX)は、直鎖状高分子を軸として複数の環状分子を貫通した構造の超分子であり、ポリエチレングリコール(PEG)と α -シクロデキストリン(α -CD)からなる PRX は最も多く研究されている PRX の一つである。当研究室では、PRX の剛直な骨格構造や環状分子の可動性といった構造的特徴を利用した生体材料を考案し、研究を展開してきた。しかし、PRX 中の α -CD 間は強固な水素結合を形成するため多くの溶媒に対する溶解性に乏しいことが知られている。一般的に、PRX 中の α -CD 水酸基にメチル基や荷電性官能基を導入することで、 α -CD 間の水素結合を切断されるため、水溶性の PRX を得ることができる。当研究室では、 α -CD にアセチル基を修飾した PRX (Ac-PRX) (Figure 1a) が、その官能基導入率によって水中での挙動が変化することをこれまでに見出している。すなわち、官能基導入率が少ない場合は水に可溶となるが、導入率が閾値(約 40%)を超えるとアセチル基同士の分子間疎水性相互作用により α -CD が会合し、ナノ粒子を形成することで可溶化する。アセチル化 α -CD の会合により形成される疎水場には疎水性の化合物を内包することができると考えられるため、本発表では Ac-PRX 会合体への難溶性薬物の内包と薬物キャリアとしての機能について検討を行った。

【実験】 軸高分子として分子量 10 万の PEG、環状分子として α -CD、封鎖基としてアダマンチル基を用いた PRX を既報に従い合成した。[1] 合成した PRX の α -CD 貫通率は 29.8%であった。PRX に対し、ピリジン中で無水酢酸と反応させることで水酸基に対してアセチル基を導入し、[2] 核磁気共鳴スペクトル (NMR)により導入率を求めた。Ac-PRX をジメチルスルフォキシド (DMSO)に溶解した後、水に対して透析することで Ac-PRX 水溶液を得た。Ac-PRX 会合体の評価は動的光散乱 (DLS)測定、および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により行った。また、難溶性薬剤であるパクリタキセルと Ac-PRX を混合し、水に対して透析することで、Ac-PRX 会合体への薬物内包を検討した。パクリタキセルの内包量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC)測定により評価した。さらに、パクリタキセル内包 Ac-PRX 会合体を HeLa 細胞に 24 時間接触させ、細胞毒性を評価した。

【結果と考察】 アセチル基導入率が 44%以上の Ac-PRX は、球状の会合体を形成することを TEM 観察より確認した (Figure 1b)。また、会合体の平均粒径は 146 nm であることを DLS 測定により確認した。Ac-PRX 会合体へのパクリタキセルの内包を透析法により行った結果、パクリタキセルの内包量は仕込み量に応じて増加し、内包量は最大で 22 wt%程度であった (Figure 1c)。このとき、薬物を内包した会合体の粒子径は大きく変化することはなかった。また、パクリタキセル内包 Ac-PRX 会合体は癌細胞に対して細胞死を誘導することを確認した。以上の結果より、Ac-PRX が形成する会合体は難溶性薬剤を可溶化する薬物キャリアとして機能すると考えられる。

【参考文献】

- [1] M Kidowaki et al., *Chem. Commun.*, 4102-4103 (2006).
[2] J. Araki et al., *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 44, 6312-6323 (2006).

Evaluation of acylated polyrotaxane nano-assemblies as a carrier for poorly-soluble drugs.

Asato Tonegawa, Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

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

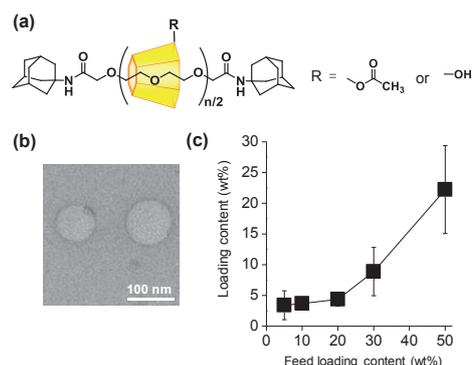


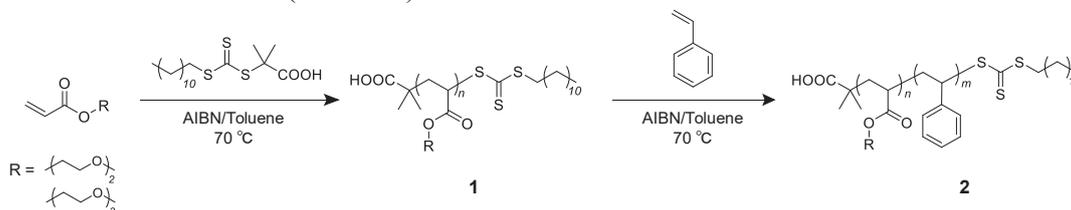
Figure 1. (a) Chemical structure of acetylated polyrotaxane (Ac-PRX). (b) TEM image of Ac-PRX (0.1 mg/mL). (c) Loading content of paclitaxel in Ac-PRX prepared at various feed loading content.

高分子ミセルの細胞内取り込みに対する水和状態の影響

¹九州大学大学院工学府, ²九州大学先端物質化学研究所, ³山形大学有機材料推進本部
○上原 広貴¹, 小林 慎吾², 田中 賢^{1,2,3}

【緒言】 現在、日本の死因第一位は「がん」であり、がん治療法の発展は人々が長く健康的な生活を送るうえで必要不可欠である。がん治療の一種である薬物療法は患者への侵襲性が低いが、抗がん剤の強い副作用の問題が指摘されている。したがって、がん組織へ薬剤を適切に輸送するドラッグデリバリーシステム (DDS) に関する研究が幅広く行われてきた。がん組織への標的指向性あるいはがん細胞内取り込みの制御は現在のがん治療が抱える副作用の問題に直結する課題であり、解決が急務である。特定のがん組織への集積性の向上を目指してがん組織周辺の血管透過性を利用した (EPR) 効果が提唱されているが、膵臓腺がんなど低血管新生のがんも存在しており、細胞内取り込み効率の改善は効率的な薬物送達に繋がると期待される。我々はこれまで、Poly(2-methoxyethyl acrylate) をコーティングした基板上において血球細胞は接着しないが、がん細胞は接着するという選択的細胞接着現象を報告しており¹⁾、この現象には高分子の水和状態、特に“中間水”の存在と量が寄与することが示唆されている^{1)・4)}。高分子ミセルの細胞内取り込みに関しては細胞-高分子ミセル間の相互作用の制御が重要であると考えられ、これまで高分子の親疎水性、弾性率、表面電荷、粒径などの影響が報告されている^{5),6)}。しかし、上述のように高分子の水和状態が生体応答に対して影響を及ぼすと考えられるにも関わらず、その細胞内取り込みに対する影響については未だ明らかにされていない。本研究では、水和状態の異なる高分子を合成し、高分子ミセルの細胞内取り込みに対する水和状態の影響を明らかにすることを目的とした。

【実験】 本研究で用いた高分子ミセルは可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 重合によって両親媒性のブロック共重合体を合成し、水中でミセル化させることで作製した。ブロック共重合体の親水性ユニットには 2-(2-Methoxyethoxy)ethyl acrylate (Me2A) および 2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl acrylate (Me3A)⁷⁾を採用し、疎水性ユニットには Styrene を採用した。合成スキームを以下に示す (Scheme 1)。



Scheme 1. Synthesis of amphiphilic block copolymer via RAFT polymerization.

合成した高分子は精製後、¹H NMR 及び GPC によって化合物の同定を行った。また、合成高分子を含水させ DSC 測定を行うことで高分子の水和状態を評価した。さらに、合成高分子を水中でミセル化させ、CMC の決定および DLS による粒径分布の評価を行った。

【結果と考察】 高分子合成に関して、¹H NMR 及び GPC の結果から、目的の化合物が得られていることを確認した。また、合成高分子を含水させ DSC 測定を行った結果、これまで報告されているような -40 °C 付近で水の凍結を示す低温結晶形成のピークが得られ、合成したブロック共重合体が中間水を形成していることが明らかになった。化合物 **1** も中間水を形成しており、含水させたブロック共重合体が形成した中間水は親水性ユニットに由来して形成されたと考えられる。当日は高分子ミセルの細胞内取り込みに対する高分子の水和状態の影響についても議論する予定である。

【参考文献】 1) M. Tanaka *et al.*, 特許第 6278321 号 2) M. Tanaka *et al.*, *Biomacromolecules*, **2002**, *3*, 36-41, 3) K. Sato *et al.*, *Macromol. Biosci.*, **2015**, *15*, 1296-1303, 4) T. Hoshiba *et al.*, *PLoS ONE*, **2015**, *10*, 1-18, 5) C. E. de Castro *et al.*, *Macromol. Biosci.*, **2016**, *16*, 1643-1652, 6) T. Stern *et al.*, *J. Control. Release*, **2017**, *257*, 40-50, 7) M. Tanaka *et al.* 特許第 4746984 号

Effect of hydration state of polymer on cellular uptake of polymer micelle

Hiroki Uehara¹, Shingo Kobayashi², Masaru Tanaka^{1,2,3}

¹Graduate School of Engineering, Kyushu University, ²Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, ³Institute of Organic Materials, Yamagata University

Tel: +81-92-802-6238, Fax: +81-92-802-6238, E-mail: masaru_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

親水性物質の内包を可能とする PEG 修飾タンパク質中空ナノ粒子の開発

¹東京農工大学大学院工学府応用化学専攻, ²東京農工大学大学院工学府生命工学専攻
 ○園瀧 誠一¹, 野口 恵一², 養王田 正文², 村上 義彦¹

【緒言】タンパク質や核酸などの親水性の生体高分子の薬物としての利用には、目的部位への送達を補助する薬物キャリアが必要である。本研究では、親水性物質のための薬物キャリアとして、細菌由来のタンパク質である encapsulin 中空ナノ粒子を応用することを目指した。encapsulin 中空ナノ粒子は、タンパク質である encapsulin がホモ 60 量体化によって形成する直径約 20 nm の強固な中空粒子である。発現過程において特定の酵素の内包が可能であることが報告されており、親水性物質を内包する薬物キャリアとしての応用が期待できる。本研究では、生体適合性の向上のためにポリエチレングリコール (PEG) を表面修飾した PEG 修飾 encapsulin 中空ナノ粒子を調製し、粒子の解離および再構成過程において親水性物質を内包させる方法を確認することで、粒子の薬物キャリアとしての応用を目指した (Fig. 1)。

【実験内容】放線菌由来の encapsulin 遺伝子に対して変異を導入することで、C 末端に His-Tag および Lys 1 残基を有する encapsulin (EH7-K1) が形成する中空ナノ粒子を獲得した。得られた粒子に methoxy-PEG-SCM (M_n : 2000) を反応させることで PEG 修飾粒子を調製した。PEG 修飾粒子の解離および再構成方法を確認するため、Si および Al を構成原子とする無機材料である Zeolite を利用した粒子の再構成を検討した。タンパク質変性剤である塩酸グアニジンの作用によって得られた PEG 修飾 EH7-K1 サブユニットを Zeolite に固定し、塩酸グアニジン除去したあとに PEG を添加することで PEG 修飾サブユニットを遊離させ、粒子の再構成を促した。 β -Zeolite (Si / Al = 27) を担体として用いた場合、吸着していたサブユニットが遊離し (遊離率 13%)、PEG 修飾粒子が再構成されることを確認した (Fig. 2)。この結果から、Zeolite を利用した PEG 修飾粒子の再構成が可能になったことが明らかになった。Zeolite からのサブユニットの遊離は使用する Zeolite の種類や溶媒によって影響を受けるため、サブユニットの遊離に適した条件を見つけることで粒子の再構成方法として利用できると考えられる。

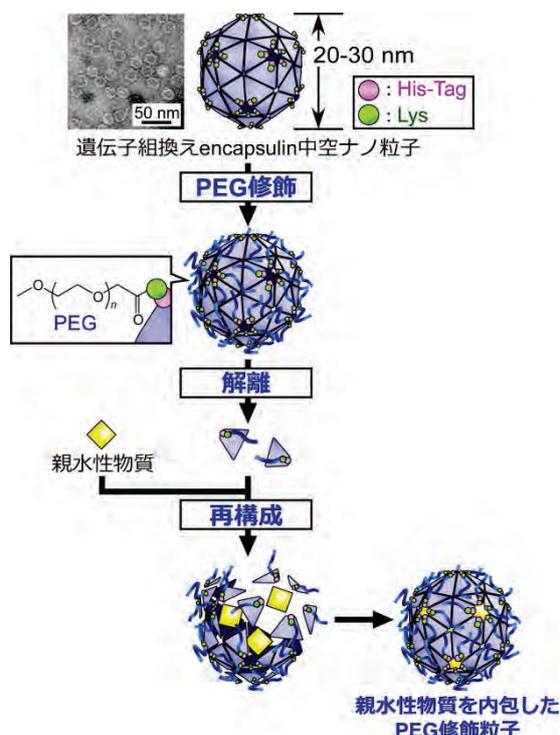


Fig. 1 薬物キャリアとしての PEG 修飾 encapsulin 中空ナノ粒子の応用

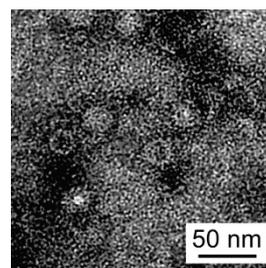


Fig. 2 β -Zeolite (Si/Al = 27) を用いて再構成した PEG 修飾粒子の TEM 画像

Development of hollow protein nanoparticles for possible incorporation of hydrophilic compounds Seiichi Sonotaki¹, Keiichi Noguchi², Masahumi Yohda², Yoshihiko Murakami¹

¹Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology

²Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

Fax:., E-mail: Tel: +81-42-388-7387, Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

血中で病因物質を捕捉し、異所代謝経路へ誘導する ナビゲーター分子の機能評価

¹ 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

² 関西大学 化学生命工学部

○古屋敷 賢人^{1,2}, 神戸 裕介¹, 平野 義明², 山岡 哲二¹

【緒言】我々は血中病因物質を捕捉し、本来とは異なる代謝経路に誘導し除去する「Drug-Navigated Clearance System」(Fig. 1)を提唱してきた^{1,2)}。これまで、透析アミロイド症をモデル疾患とし、その病因物質であるβ2ミクログロブリン(β2MG)を捕捉し、本来(腎臓)とは異なる代謝経路である肝臓へ誘導する「ナビゲーター分子」の作製に取り組んできた。In vitro におけるナビゲーター分子のβ2MG 捕捉能や肝臓細胞結合能が示されてきたものの、in vivo やそれに近い条件、特に血中でのナビゲーター分子の機能は不明な点が多い。そこで本研究では、in vivo におけるナビゲーター分子の機能を明らかにするため、血漿中におけるβ2MG 捕捉能評価、マウス体内における肝臓蓄積能評価を行った。

【実験】組換え大腸菌を用いてβ2MG 捕捉分子(主要組織適合遺伝子複合体(MHC) α3ドメイン(α3))と肝臓への誘導分子(アポリポタンパクEのN末端ドメイン(ApoE))とのキメラタンパク(ApoE-α3)を合成後、1,2-ジミリスチル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)と複合体を形成させてナビゲーター分子とした。ナビゲーター分子とβ2MGを50 vol%マウス血漿含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で混合し、抗MHC α3抗体固定化磁気ビーズによる免疫沈降(IP)及び抗β2MG抗体を用いたウエスタンブロット(WB)を行った。

Alexa750 標識したナビゲーター分子(Alexa750 標識ナビゲーター分子)を、血中濃度が1 μMとなるようにC57BL/6Nマウス(雄、10-13週齢)に尾静脈投与した。1, 2, 4, 12, 24時間静置した後、採血、採尿し、ヘパリン含有PBSを全身灌流した後に臓器を摘出した。In vivo イメージャーを用いて臓器の蛍光強度を測定し、Alexa750 標識ナビゲーター分子の体内動態を評価した。

【結果と考察】IPとWBの結果、β2MGとナビゲーター分子の混合溶液から得られた沈降物にβ2MGが存在することが分かった。これより、50%マウス血漿含有PBS雰囲気でのナビゲーター分子のβ2MG捕捉能が示された。

Alexa750 標識ナビゲーター分子のマウス体内動態を評価した結果、ナビゲーター分子の血中投与後1~4時間にかけてナビゲーター分子の肝臓内蓄積量が増加した。この間、肝臓への蓄積量は、他の臓器と比べて多かった。また、その後、肝臓内蓄積量は低下したことから、ナビゲーター分子が肝臓へ蓄積した後に排泄されることが示唆された。

発表では、ナビゲーター分子によるβ2MGの体内動態制御についても報告する予定である。

【参考文献】1) 特許 5429804 号 2009, 2) US8,834,887 B2 2014

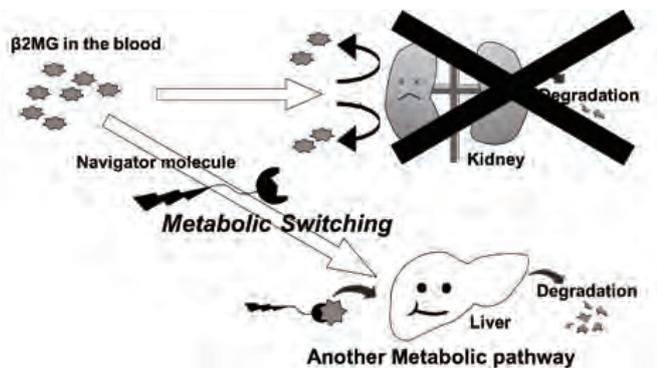


Fig. 1. Concept of DNCS. A navigator molecule captures β2MG and navigates it to the liver metabolic pathway.

Evaluation of navigator molecule to capture an etiologic agent in the blood and navigate it to the ectopic metabolic pathway.

Kento Koyashiki^{1,2}, Yusuke Kambe¹, Yoshiaki Hirano², Tetsuji Yamaoka¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

²Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

¹Tel: +81-6-6833-5012, FAX: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

高機能・高品質脂質による HER2 指向リポソームの開発：膵癌への DDS キャリアとしての応用

長崎大学 大学院 医歯薬学総合研究科

○菅 忠明, 内山詩乃, 三浦雄介, 萩森政頼, 黒田直敬, 川上 茂

【緒言】

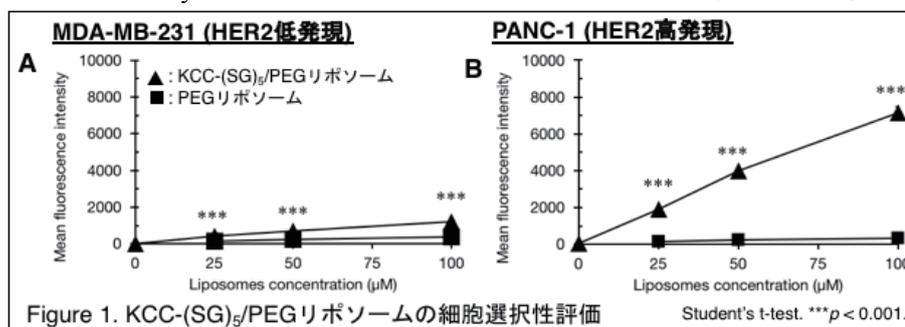
我々は、高機能・高品質 (High Functionality and Quality: HFQ) 脂質による新たなナノ DDS 製剤調製技術体系の構築に取り組んでいる。これまで、悪性乳癌の HER2 に結合するペプチド (KCCYSL) をリガンドとする KCC-(SG)₅-lipid を開発し (T. Suga, et al. *Int. J. Pharm.* 521, 361-364, 2017)、本脂質を用いることで PEG リポソームに HER2 高発現の乳癌細胞への高い指向性を付与できることを報告した。近年、HER2 は膵癌においても発現することが報告されており、膵癌における新たな治療標的として注目されている。一方で、膵癌における HER2 のターゲティングに関する報告はまだ少なく、膵癌細胞に対する HER2 指向 DDS キャリアの有用性は明らかとなっていない。そこで本研究では、これまで我々が開発してきた HER2 指向リポソームが膵癌ターゲティングキャリアとして応用可能であるか検討を行った。

【実験】

KCC-(SG)₅-lipid は Fmoc 固相合成により合成し、MALDI-TOF-MS により確認した。KCC-(SG)₅-lipid で修飾した PEG リポソームは、KCC-(SG)₅-lipid と PEG リポソームを混和 (Post-insertion 法) して調製した。Rhodamine で標識した KCC-(SG)₅/PEG リポソームを細胞に添加してフローサイトメトリーにより定量し、KCC-(SG)₅/PEG リポソームの細胞選択性を評価した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて KCC-(SG)₅/PEG リポソームの細胞内動態を評価した。

【結果と考察】

KCC-(SG)₅/PEG リポソームは、約 100 nm の粒子径および中性の電荷を示した。HER2 を高発現する膵癌細胞株 (PANC-1) および HER2 を低発現する乳癌細胞株 (MDA-MB-231) を用いて KCC-(SG)₅/PEG リポソームの細胞選択性の評価を行ったところ、PANC-1 細胞において KCC-(SG)₅/PEG リポソームの細胞取り込みは、インキュベーション時間およびリポソーム濃度依存的に増加した (Figure 1A)。一方で、MDA-MB-231 細胞においては KCC-(SG)₅ 修飾による細胞取り込みの増加をほとんど認められず、KCC-(SG)₅/PEG リポソームは HER2 の発現する膵癌細胞に選択的に取り込まれる可能性が示された (Figure 1B)。また、共焦点レーザー顕微鏡により KCC-(SG)₅/PEG リポソームの細胞内動態を評価した結果、KCC-(SG)₅/PEG リポソームは細胞内においてライソソームマーカーである LysoTracker の蛍光と共局在している様子が観察された。したがって、KCC-(SG)₅/PEG リポソームは PANC-1 細胞へ取り込まれ、ライソソームへ輸送される可能性が示された。以上、HER2 指向リポソームによる膵癌細胞のターゲティングに初めて成功した。



Development of HER2-targeted high functionality and quality (HFQ) lipid-grafted PEGylated liposomes: Evaluation as pancreatic cancer-targeted DDS carrier

Tadaharu Suga, Shino Uchiyama, Yusuke Miura, Masayori Hagimori, Naotaka Kuroda, Shigeru Kawakami
Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

Tel: +81-95-819-8563, Fax: +81-95-819-8563, E-mail: bb55717003@ms.nagasaki-u.ac.jp

pH 応答性デキストラン被覆したキトサン誘導体修飾リポソームによる 抗がん剤デリバリー

大阪府立大学大学院工学研究科
○中井 志保, 弓場 英司, 原田 敦史

【緒言】がん化学療法における薬効の増強と、副作用の低減によるQOL向上のために、がん細胞に抗がん剤を効率よく運搬する薬物送達システムの開発が望まれている。当研究室ではこれまで、ポリグリンドールや多糖をベースにしたポリカルボン酸誘導体を

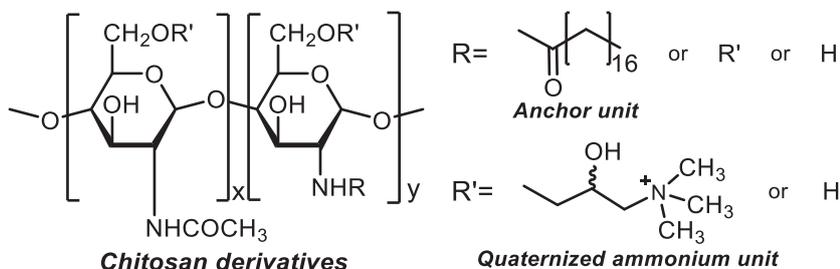


Fig. 1. Structure of stearic and quaternized ammonium cation-introduced chitosan derivatives.

固定化した pH 応答性リポソームの開発に成功している。このリポソームは細胞内の弱酸性環境に
応答してカルボン酸が疎水化し、エンドソーム膜を不安定化して内包物をサイトゾルに放出した。
しかし、pH 応答性を持つがゆえに、リモートローディング法 (pH 勾配法) を用いてアントラサイク
リン系抗がん剤 (ドキソルビシン, Dox) を封入することはできない。そこで本研究は、Dox を封
入でき、かつ鋭敏な応答性を実現する pH 応答性高分子修飾リポソームの構築を目的とした。多くの
pH 応答性高分子がポリカルボン酸であることに注目し、長鎖アルキル鎖の疎水性相互作用に加え、
正荷電を持つ多糖キトサンとの静電相互作用を利用して、Dox 封入キトサン修飾リポソーム
へ pH 応答性高分子を固定化させ、鋭敏な応答性を持つ pH 応答性リポソームの作製を試みた。

【実験】EDC を用いてキトサンのアミノ基とステアリン酸を縮合させることで、リポソームへの
固定化部位を導入したキトサン誘導体 (SC) を合成した。続いて、
(3-Chloro-2-hydroxypropyl)trimethylammonium chloride との反応により第 4 級アンモニウムカ
チオンを導入した 4 級化 SC を合成した。SC または 4 級化 SC と EYPC, cholesterol, PEG_{2k}-DSPE から
成るリポソームを作製した。そこに pH 応答性高分子 (CHex-Dex-C10 溶液) を混合することで、
疎水性相互作用、またはキトサンと pH 応答性高分子の静電相互作用によってリポソーム表面に被
覆した。得られたリポソームの粒径・ゼータ電位を測定した。Dox を封入したリポソームを用い
て、種々 pH における内包物放出挙動を蛍光測定によって調べた。蛍光ラベルしたリポソームを用
いて、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞によるリポソームの取り込みについて調べた。また、HeLa
細胞に対する毒性を MTT アッセイにより調べた。

【結果と考察】アンカー基を 2%、4 級アンモニウムカチオンを 70% 導入した 4 級化 SC を合成し
た。4 級化したことにより、水溶性が向上した。これらのポリマーを用いて作製したリポソーム
の粒径は 120 nm 程度であり、4 級化 SC 修飾リポソームのゼータ電位は約 +20 mV であったが、
CHex-Dex-C10 を混合後のゼータ電位は -22 mV 程度であった。粒径の増大と、 ζ 電位の変化より、
CHex-Dex-C10 の表面被覆が示唆された。CHex-Dex-C10 を被覆したリポソームは、中性では Dox を
安定に保持したが、pH の低下とともに Dox を放出した。特に 4 級化 SC を用いたリポソームは、
他に比べより高い pH で Dox を放出した。これは、4 級化 SC との静電相互作用により、CHex-Dex-C10
の固定化量が増加したためであると考えられる。また、リポソームの細胞内動態を観察したと
ころ、Dox が細胞核まで到達していることを確認した。これらの結果を反映して、4 級化 SC を用い
たリポソームは未修飾リポソームや SC リポソームに比べ、より高い殺細毒性を示した。

Development of chitosan derivative-modified liposomes covered with pH-sensitive dextran for anticancer drug delivery

Shiho NAKAI, Eiji YUBA and Atsushi HARADA

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University

Tel: +81-72-254-9330, Fax: +81-72-254-9330, E-mail: yuba@chem.osakafu-u.ac.jp

線維長の制御されたペプチドナノファイバーの作製と 抗原デリバリーへの応用

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
○小枝清花, 和久友則, 田中直毅

【緒言】

近年、ナノチューブやナノファイバーなどの『一次元ナノ材料』が DDS キャリアとして注目を集めており、リポソームや高分子ミセルなどの球状材料にはない新たな機能の創出に関心が高まっている。一次元ナノ材料の長さの違いは体内動態、細胞内取り込み挙動、細胞内動態などに大きく影響を与える。そのため、長さ分布の狭い単分散性一次元ナノ材料を得るための精密作製技術の確立が重要である。一方、我々は β -シートペプチドナノファイバーに着目し、これを用いた抗原デリバリーシステムの開発に取り組んでいる。これまでに、線維形成配列 (FVIFLD) に抗原配列 (SIINFEKL) および親水性鎖 (24mer オリゴエチレングリコール) を導入したペプチド (EG₂₄) を合成し、その自己組織化による抗原担持ペプチドナノファイバーの作製を報告した。しかしながら、ペプチドナノファイバー (NFs) の長さの制御が困難であり、長さと言質・機能との相関を明らかにすることができていない。そこで、線維伸長の制御による単分散性ペプチドナノファイバーの作製を本研究の目的とする。

アミロイド線維は、核形成過程と生長過程を経て形成することが知られている。もしこの機構で、本研究で用いる NFs が形成するのであれば、自発的に会合しない濃度のペプチド溶液に、核となる線維断片 (シード) を外部添加した場合、シードからの伸長のみが起こると期待される。シードからの伸長を制御することで単分散性ペプチドナノファイバーを作製できると考えた。

【実験】

1. シード溶液及びペプチド溶液の作製

EG₂₄ ペプチド (FVIFLDGSGSIINFEKL-oligo(ethylene glycol)₂₄) をリン酸緩衝生理食塩水中で 80°C、1 h、加熱することで NFs を作製した (300 μ M)。得られた NFs 分散液に超音波照射することにより、NFs の線維長を約 100 nm に制御した (シード溶液)。また、EG₂₄ ペプチドを DMSO に溶解したものをペプチド溶液とした (500 μ M)。

2. シードを用いた線維形成挙動の観察

シード溶液 (終濃度 12.5 μ M) とペプチド溶液 (終濃度 5-15 μ M) を混合し、24 h、37°C でインキュベーションした。インキュベーション後の NFs の線維長を透過型電子顕微鏡 (TEM) 像により見積もった。

【結果・考察】

シード存在下、種々の濃度のペプチド溶液を 37°C で 24 h インキュベーションした際に形成した会合体を TEM により観察した (Fig. 1)。Fig. 1 から、任意の NFs (n = 50) の平均線維長を測定した。シードに用いた NFs の線維長は 100 \pm 50 nm であった。これに対して、ペプチドを共存させた場合には、ペプチド濃度が 5, 10, 15 μ M のとき

に得られたナノファイバーの線維長はそれぞれ、130 \pm 60 nm、150 \pm 70 nm、200 \pm 70 nm であり、ペプチド濃度の増加に伴って線維長が長くなることがわかった。

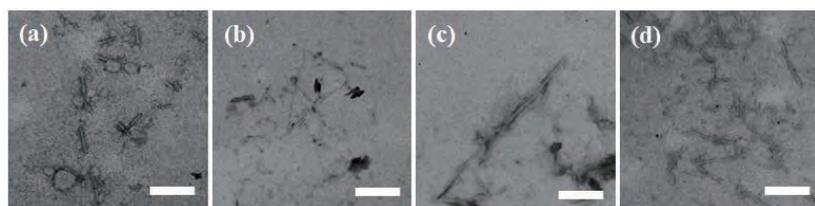


Fig. 1 Negatively stained TEM images of (a) EG₂₄ seeds and (b-d) nanofibers obtained by incubation of EG₂₄ peptide at various concentrations for 24 h at 37°C in the presence of seeds (12.5 μ M). The peptide concentrations were 5 μ M (b), 10 μ M (c), and 15 μ M (d) (scale bar; 200 nm).

Preparation of peptide nanofibers with precisely controlled fiber length and their application for antigen delivery

Sayaka KOEDA, Tomonori WAKU, Naoki TANAKA (Faculty of Molecular Chemistry and Engineering, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan)

Tel: +81-75-724-7861, Fax: +81-75-724-7861, E-mail: tanaka@kit.ac.jp

眼病予防薬剤を内包した高分子超薄膜の調製と機能評価

¹東海大学大学院工学研究科, ²東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター

○坪井 亮¹, 熊坂 実優¹, 金森 審子¹, 横山 奨², 木村 啓志^{1,2}, 岡村 陽介^{1,2}

【緒言】目の病として紫外線吸収過多による角膜炎、白内障や加齢性黄斑変性などが挙げられる^{1,2)}。これらの予防策として、近年、紫外線や青色光の吸収特性や黄斑部の酸化防止作用を有し、網膜内に存在するルテインが注目されている。しかし、体内での合成は不可能であり、錠剤等の経口摂取が主流であるため、即効性や摂取効率の低さが懸念されている³⁾。他方、高分子を超薄膜(膜厚 100 nm 以下; ナノシート)に加工すると、ナノ厚特有の透明性、高柔軟性、高接着性が発現し、物理吸着のみで種々の界面(ガラス, プラスチック, 生体組織等)に貼付可能となる⁴⁾。本研究では、眼病予防を鑑みた新規医用材料の創製として、高分子超薄膜へのルテイン内包技術を確立し、ルテインの徐放性、並びに光吸収特性について検証する。

【実験】SiO₂基板(2 × 2 cm²)上にポリビニルアルコール(PVA: 10 mg/mL)水溶液を滴下後、スピンドコート(4000 rpm, 20 s)して犠牲膜とした。次いで、ポリ乳酸(PLLA: 10 mg/mL)/ルテイン(0-10 mg/mL)/ α -トコフェロール(0-10 mg/mL)の混合クロロホルム溶液を滴下して同条件下でスピンドコート後、基板ごと純水中に浸漬させることでルテイン内包ナノシートを調製した。得られたナノシートをSiO₂基板に貼付し、微細形状測定器(Dektak XT, Bruker 社製)にて膜厚を測定した。また、ナノシートを再溶解後、マイクロプレートリーダー(SH-9000, コロナ電気社製)にて吸光度を測定し、ルテイン濃度を定量した。

【結果と考察】SiO₂基板上にPVA、ルテイン含有PLLA溶液の順にスピンドコートした。基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲膜が瞬時に溶解し、基板の形状を維持した状態でナノシートを回収できた。得られたナノシートはルテイン由来の黄色を呈していた。この時、ルテイン濃度の上昇に伴い、膜厚と内包量が増加していた(Fig. 1)。よって、ルテインの濃度調整によって膜厚・内包量の制御が可能であると示唆される。上述のように、ルテイン内包ナノシートは黄色を呈しているが、数日経過すると無色透明に変化した。そこで、抗酸化剤である α -トコフェロールを添加したところ、ルテイン内包ナノシートの黄色が維持されることが確認できた。実際、吸光度測定の結果から、 α -トコフェロールの併用により少なくとも1週間はルテイン由来の吸収が維持されていた(Fig. 2)。従って、 α -トコフェロールの添加はルテインの機能維持に有効であることを見出した。また、 α -トコフェロール最適濃度として、少なくとも0.01 mg/mLの添加でルテインの吸収が維持されることを確認した。現在、ルテインの機能性評価としてヒト細胞株への紫外線吸収試験、並びに涙液への徐放試験を検討しており、当日併せて報告する。

【参考文献】

(1) Hayashi A. *ファルマシア* 50.3 (2014): 212-216. (2) Ohnaka T. *Ann. Physiol. Anthropol.* 12.1 (1993): 1-10. (3) Kanamura K. *et al.* *大豆たん白質研究* 12.30 (2009): 46-50. (4) Okamura Y. *et al.* *Adv. Mater.* 21 (2009): 4388-4392.

Fabrication and Evaluation of Polymer Nanosheets Loading medicine for Prevention of Ophthalmopathy

Ryo Tsuboi¹, Miyu Kumasaka¹, Akiko Kanamori¹, Sho Yokoyama², Hiroshi Kimura^{1,2}, Yosuke Okamura^{1,2}

¹Graduate School of Engineering, Tokai University

²Micro/Nano Technology Center, Tokai University

¹Tel: 0463-58-1211 (Ex. 4692), Fax: 0463-50-2456, E-mail: 7BAJM029@cc.u-tokai.ac.jp, y.okamura@tokai-u.jp

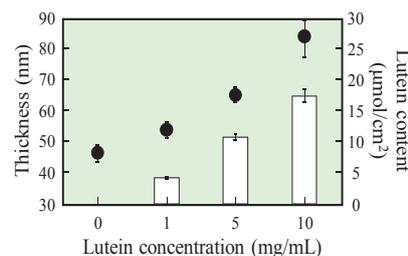


Fig. 1 Correlation of thickness and lutein content of nanosheets with lutein concentration.

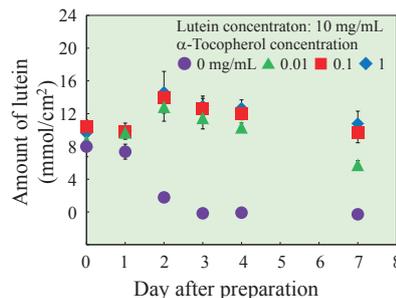


Fig. 2 Stability of lutein into the nanosheets day after preparation.

インプラントブル細胞培養デバイスの開発

¹東北大学大学院工学研究科, ²東北大学大学院医学系研究科
○小島 秀仁¹, 永井 展裕², 西澤 松彦¹, 阿部 俊明², 梶 弘和¹

【緒言】 ドラッグデリバリーシステム (DDS) とは, 目標とする患部に, 薬物を必要量, 必要な期間だけ送達するシステムである. DDS により集中的かつ効果的な治療の実現が期待される. 一般の薬物投与方法は薬物量の制限により頻回投与が必要となり, 患者への負担が大きいことが課題となっている. 近年の遺伝子改変技術の発展により, 細胞に目的の物質を分泌させることが可能となってきた. これを利用し, 薬物遺伝子を導入した細胞を用いた DDS に関する研究がなされている. この手法は薬物となるタンパク質を分泌する細胞を移植するため, 頻回投与を必要としない. 以上のような背景から本研究では細胞を用いた DDS デバイスの開発を目的とした. 本デバイスは遺伝子導入細胞, リザーバおよび内部マトリックスにより構成される. ここでは, リザーバの作製を行った後, 細胞の足場となる内部マトリックスの検討を行った.

【実験】 本デバイスに使用する細胞としてヒト網膜色素上皮 (ARPE) 細胞を用いた. リザーバは PDMS (Polydimethylsiloxane) および TEGDM (Triethylene glycol dimethacrylate) を用いて作製した. リザーバ内への細胞および内部マトリックスの注入は 18G の注射針を用いてリザーバ上部よりインジェクションすることにより行った. 内部マトリックスの検討として, コラーゲンゲルおよび架橋剤 (4arm-PEG10K-Succinimidyl Glutarate) を添加したコラーゲンゲル内での ARPE 細胞の三次元培養を行い, 細胞生存率の評価を行った. また ARPE 細胞を本来の形状で培養するために, ポリスチレン (PS) 製シート上で細胞を培養したものを 1% ヒアルロン酸水溶液とともにデバイス内へ注入し, 細胞の状態を観察した.

【結果と考察】 図 1 に作製したリザーバの外観を示した. デバイス底部には 0.5mm のポアが開いており, ここからデバイス内への栄養供給および薬物の放出を行う. 内部マトリックスの検討としてコラーゲンゲルおよび架橋コラーゲンゲル内で ARPE 細胞の三次元培養を行ったが, 培養開始から 10 日間で細胞の生存率は著しく減少し, コラーゲンゲル, 架橋コラーゲンゲルともに長期間高い細胞生存率を維持することは困難であることが示唆された. これはゲル内では ARPE 細胞は本来の多角形状とは異なり丸い形状であるため, 細胞が正常に機能できなかったためであると考えられる. また図 2 に PS 製シートと細胞をヒアルロン酸水溶液とともにデバイス内へ注入した後の様子を示した. 図に示すように細胞とシートをあらかじめ蛍光染色することで細胞がシート表面に接着している状態でデバイス内に注入できていることが確認された. この手法では ARPE 細胞は本来の形状での培養が可能であり, 細胞が正常な機能を維持できると考えられる. 今後は PS 製シート上で細胞を長期的に培養することができるかを確認し, 細胞から分泌されるタンパク質の量を測定する予定である. またデバイス内の細胞を免疫系から守るための保護膜の検討も行っていく予定である.

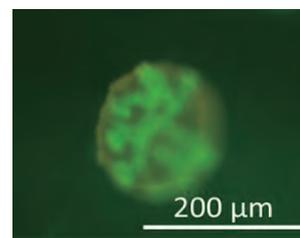
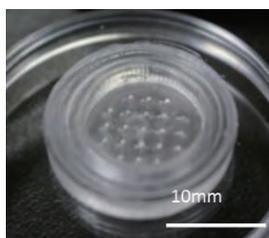


図 1. 細胞培養リザーバ 図 2. シート上の細胞

Development of an implantable cell culture device

Hidetō Kojima¹, Nobuhiro Nagai², Matsuhiko Nishizawa¹, Toshiaki Abe², Hirokazu Kaji¹

¹Graduate School of Engineering, Tohoku University ²Graduate School of Medicine, Tohoku University
Tel: +81-022-795-3586, Fax: +81-022-795-3586, E-mail: hideto.kojima.t4@dc.tohoku.ac.jp

上皮成長因子固定化金ナノ粒子のアポトーシス誘導活性における細胞内応答機構の探究

¹物質・材料研究機構, ²農業・食品産業技術総合研究機構, ³神奈川大学理学部
○山本 翔太¹, 岩丸 祥史², 清水 善久¹, 山口 和夫³, 中西 淳¹

【緒言】 材料に固定化された生理活性物質は、拡散性や細胞内トラフィックの変化により、通常の液性因子とは異なる細胞応答を惹起する。例えば、細胞増殖を誘導する上皮成長因子(EGF)を固定化したバイオマテリアルは、エンドサイトーシスによる脱感作を回避して長時間活性を維持するため、より効果的に細胞の成長や分化を誘導する[1]。一方で、EGFを固定化した金ナノ粒子は、がん細胞に対してアポトーシス活性を示す [2]。特に後者に関しては、抗がん剤の標的分子であるEGF受容体に作用することで効果を発揮するため、がん細胞選択的な抗がん剤として期待される。しかしながら、本来は細胞の成長・分化を促進するEGFが、なぜ金ナノ粒子に固定化されることで正反対のアポトーシス活性を獲得するのか、その詳細なメカニズムについては明らかになっていない。そこで本研究では、EGF受容体が高濃度に存在する脂質ラフトと呼ばれる細胞膜のナノドメインに注目し、金ナノ粒子-上皮成長因子コンジュゲート(EGF-GNPs)の特異なアポトーシス誘導活性の作用機構を探究した。

【実験】 α -aminopropyl- ω -methoxy PEG (MW = 5000)と disuccinimidyl 11,11'-dithiobisundecanoate (DSU)を反応させて得たジスルフィド体とDSU自身を8:2の割合で混合したDMSO溶液で、20 nm金ナノ粒子の表面修飾を行い、得られた粒子とEGFを4°Cにて終夜反応させることでEGF-GNPsを得た。HeLa細胞にEGF-GNPsを加え、下流のシグナル伝達の活性化と膜質の分布をリン酸化アッセイ、Annexin V染色、脂質ラフトの生化学的分離および暗視野観察により調べた。

【結果と考察】 調製したEGF-GNPsは、粒径が約50 nmであり、1粒子あたり51個のEGFが固定化されていた。このEGF-GNPsをHeLa細胞に投与し、その生理活性をEGFRの下流のシグナル伝達経路であるERKを指標に調べたところ、EGF-GNPsは溶液状態のEGF(soluble EGF)と同様にEGF濃度の増加に伴い活性化し、100 ng/mL添加時に最大応答を示した。その濃度を用いてEGF-GNPsまたはsoluble EGFを投与すると、EGF-GNPsのみ72時間後に約80%の細胞をアポトーシスへ至らしめた。そこでフローテーションアッセイにより、生化学的にEGF受容体の膜内分布を調べたところ、soluble EGFで刺激した際、EGF受容体が即座に脂質ラフトから抜け出したのに対し、EGF-GNPsを作用させた場合はそのほとんどが脂質ラフト内に留まった。さらに暗視野観察によりEGF-GNPsは、通常のsoluble EGFとは異なる経路で細胞内に取り込まれた。この特徴的な作用を示すEGF-GNPsのリン酸化パターンを調べると、soluble EGFと比べてERKのリン酸化は長期間活性を持続し、一方でAKTのリン酸化は半分程度に留まり、徐々に減衰した。そのためこの特殊なリン酸化パターンがアポトーシス誘導活性の鍵を握ると考え、AKT活性化剤およびERK阻害剤でHeLa細胞を処理すると、EGF-GNPsのアポトーシス誘導能はほとんど失われた。最後に、脂質ラフトの形成を阻害する β -cyclodextrinであらかじめ処理した細胞で同様の実験を行うと、EGF-GNPsが誘起するERKとAKTのリン酸化パターンは大きく変化し、EGF-GNPsはアポトーシス活性を示さなかった。以上の結果より、EGF担持金ナノ粒子は、細胞内シグナル伝達を脂質ラフト内に凝縮することで特異なリン酸化パターンを誘導し、アポトーシス誘導能を獲得していることが分かった。

【参考文献】

1) Y. Ito, *Soft Matter* **2008**, 4, 46. 2) L. Wu, X. Yu, A. Feizpour, B.M. Reinhard, *Biomater. Sci.* **2014**, 2, 156

A mechanism study of unique apoptotic activity of epidermal growth factor immobilized on gold nanoparticles

Shota Yamamoto¹, Yoshifumi Iwamaru², Yoshihisa Shimizu¹, Kazuo Yamaguchi³, Jun Nakanishi¹

¹National Institute for Materials Science, International Center for Materials Nanoarchitectonics

²National Agriculture and Food Research Organization

³Department of Chemistry, Kanagawa University

Tel: +81-29-860-4569, Fax: +81-29-860-4706, E-mail: NAKANISHI.Jun@nims.go.jp

コウジ酸修飾カルボラン-シクロデキストリン複合体の BNCT ホウ素薬剤としての評価

¹大阪市立大学大学院工学研究科, ²大阪府立大学 BNCT 研究センター, ³京都大学複合原子力科学研究所

○堂脇 聖史¹, 松浦 昂紀¹, 河崎 陸¹, 服部 能英², 櫻井 良憲³, 増永 慎一郎³, 切畑 光統², 長崎 健¹

【緒言】皮膚がんの一種であり、転移能が高い悪性黒色腫(メラノーマ)は、ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)のターゲットの一つである。BNCTとは、がん細胞に対して選択的にホウ素化合物を取り込ませ、そこに熱中性子線を照射し、¹⁰B と核反応を引き起こすことで、がん細胞のみを破壊する治療法のことである(Fig.1)。BNCT に用いられる薬剤には、高いホウ素原子占有率、がん細胞選択性、高い水溶性が求められる。本研究では、ホウ素原子占有率の高いカルボランと、メラノーマ細胞選択性を有するコウジ酸を修飾することで、コウジ酸修飾カルボラン(CKA)を開発した。また、CKA は難水溶性であったが、Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD)を用いて、疎水性部分を包接することで水溶化に成功した。そして、CKA の BNCT 薬剤としての機能評価を行った後、CKA 自体にメラノーマの転移を抑制する効果があると示唆された。したがって、CKA のメラノーマ転移抑制剤としての評価も行った。

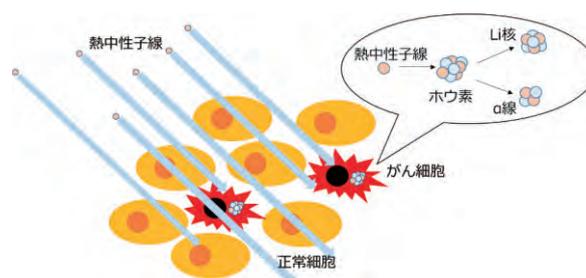


Fig.1 Principle of BNCT

【実験】CKA は HP-β-CD と超純水に溶かし、混合、攪拌、超音波処理することで水溶化した。この複合体の細胞毒性評価、担がんマウス体内動態を評価した後、BNCT 評価を行った。BNCT 評価は、作製した担がんマウスに対して、中性子線の照射の 90 分前に薬剤のホウ素総量が 3 μg になるように投与した。投与から 90 分後に、1 MW で 90 分間中性子線を照射し、その後のマウスのサバイバルを追跡した。そして、CKA のメラノーマ転移抑制能を、スクラッチアッセイやマウスの臓器から抽出した RNA を用いたリアルタイム PCR 法によって評価を行い、CKA の細胞内移行メカニズムについても検証を行った。

【結果と考察】水溶化した CKA は、選択的・効率的にメラノーマ細胞に取り込まれることを確認した。BNCT 評価では、従来の薬剤である L-BPA に比べ、高い延命効果を示し、濃度依存的に効果が増大していることがわかった。また、この時、CKA の投与のみで、中性子線を照射しなかったマウスが、コントロールマウスに比べ、高い延命効果を示していることが分かった。この原因として、CKA は、がんの転写促進因子である HIF-1α の発現を抑制することで、メラノーマ細胞の肺への転移を抑制する効果を有していることが見出された。そして、ウェスタンブロットによる HIF-1α の発現評価や、スクラッチアッセイやリアルタイム PCR 法によるメラノーマの転移抑制評価によって、その効果を確認した。また、CKA はコウジ菌のグルコース代謝物として知られているため、CKA はグルコーストランスポーター1 (GLUT1) を介してメラノーマ細胞内へ移行すると予想された。実際に、GLUT1 を阻害することで取り込み量が減少したことから、GLUT1 を介した取り込みであることが示唆された。以上の結果より、CKA はメラノーマに対する新規の BNCT 用薬剤としてのみならず、メラノーマの転移抑制剤としても有効である可能性を見出した。

Evaluation of cyclodextrin complex with kojic acid modified carborane developed as BNCT boron agent.

Satoshi Dowaki¹, Koki Matsuura¹, Riku Kawasaki¹, Yoshihide Hattori², Yoshinori Sakurai³, Shinichiro Masunaga³, Mitsunori Kirihata², Takeshi Nagasaki¹

¹Graduate School of Engineering, Osaka City University, ²Research Center for BNCT, Osaka Prefecture University, ³Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University

Tel: +81-06-6695-2695, E-mail: s.dowaki.5121@gmail.com

有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子の one-pot 合成と肝繊維症治療への応用

¹九州大学大学院歯学研究院, ²名古屋大学未来材料・システム研究所
○林 幸彦朗^{1,2}, 丸橋 卓磨², 坂本 渉², 余語 利信²

【緒言】

肝硬変は肝臓が線維化し本来の機能を果たせなくなった状態である。線維化が進行すると、肝性脳症や食道静脈瘤などの重篤な症状や合併症が現れる。さらに、食道静脈瘤が破裂すると大量の出血によりショック死を招く。また、線維化により肝がんのリスクも高まる。

本研究では、①線維化を引き起こす二種類の細胞（クッパー細胞と肝星細胞）をターゲティングする機能、②これらの細胞内の活性化を阻害する物質を細胞内で放出する機能、③線維化を引き起こす活性酸素を除去する機能を併せ持つ有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子を合成し、このナノ粒子を用いて線維化した組織を修復し、肝機能を回復させることを試みた。

【実験】

チオールまたはチオシアネートを有するシリコンアルコキシドを用いた加水分解・縮合反応により、有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子を one-pot で作製した^[1]。有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子の構造および機能をラマン、FTIR、TEM 等により解析した。

マウスへの四塩化炭素継続的投与により肝線維症を誘発した。肝線維症マウスに有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子を投与し、免疫組織染色および生化学検査により治療効果を評価した。

【結果と考察】

有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子の骨格はジスルフィドとシロキサンからなり、ナノ粒子表面にはチオールを有していた。このような構造をもつため、この有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子はクッパー細胞が作り出す活性酸素を除去した。さらに、細胞内において有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子は崩壊し、肝星細胞の増殖と損傷部への遊走性を阻害する物質を放出した。

有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子を肝線維症マウスに静脈内投与したところ、肝組織の免疫染色により、有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子はクッパー細胞および肝星細胞をターゲティングすることが明らかになった。さらに、有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子の静脈内投与を週一回のペースで二週間行くと、線維化した組織が修復され、肝機能が回復することが、肝組織のシリウスレッド染色および生化学検査により明らかになった。

以上より、有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子は肝線維症、肝硬変の治療に応用できる可能性があることが明らかになった。

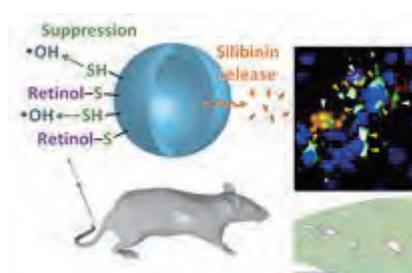


図. 有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子（左上）を肝線維症マウスに静脈内投与するとクッパー細胞及び肝星細胞に選択的に集積し（右上）、繊維化の程度を改善させ（右下）、肝機能を回復させた。

[1] Hayashi et al. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 8613.

[2] Hayashi et al. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1706332.

One-pot synthesis of organic-inorganic hybrid hollow nanoparticles and treatment of hepatic fibrosis

Koichiro Hayashi^{1,2}, Takuma Maruhashi², Wataru Sakamoto², Toshinobu Yogo²

¹Department of Biomaterials, Faculty of Dental Science, Kyushu University

²Division of Materials Research, Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University

Tel: +81-92-642-6345, Fax: +81-92-642-6348, E-mail: khayashi@dent.kyushu-u.ac.jp

経口投与製剤としての応用を目指した脂質複合化高分子ミセル ～形成特性・構造評価～

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻
○沖田 一步, 村上 義彦

【緒言】

経口投与は、薬物の服用が簡便であることから、現在最も汎用されている投与経路である。しかし、経口投与では、消化器官内における pH 変化や消化酵素の作用によって薬物が変性する可能性があるため、薬物キャリアの利用や製剤化技術によって安定に薬物を送達することが求められる。一般に、消化管内部を覆っている内皮細胞は、隣り合う細胞同士でタイトジャンクション（密着結合）を形成しているため、高分子量の薬物（あるいは薬物キャリア）が吸収されにくい。そこで、細胞間のタイトジャンクションを緩める作用があることが報告されているリゾリン脂質に着目した。リゾリン脂質は特定の細胞に作用する薬物として用いることも可能である。本研究では、両親媒性ブロック共重合体とリゾリン脂質から複合化高分子ミセルを調製し、リゾリン脂質とともに製剤化した経口投与製剤の開発を目指した。

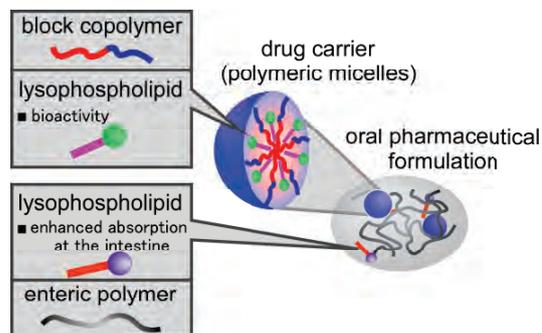


Fig. 1 Preparation of oral pharmaceutical formulation containing lipid-polymeric micelles

【実験】

2-メトキシエタノールの末端をカリウムナフタレンによりメタル化し、エチレンオキシド、D,L-ラクチドを順次添加して攪拌した後、酢酸によって反応を停止することにより、末端メトキシ化ポリエチレングリコール-*b*-ポリ乳酸（methoxy-PEG-*b*-PLA）を合成した。得られたブロック共重合体を用いて、高分子ミセル、およびブロック共重合体とリゾリン脂質（ミルテフォシン、ペリフォシンまたはリゾホスファチジン酸）を複合化した高分子ミセル水溶液をエバポレーション法によって調製した。動的光散乱（DLS）による粒径分布の測定から、各高分子ミセルの形成を確認した。その後、複合化ミセル水溶液をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより分取し、各画分の³¹P-NMRを行うことによって、各リゾリン脂質の高分子ミセルへの複合化の有無を評価した。また、質量分析法により、リゾリン脂質を複合化した高分子ミセルにおけるリゾリン脂質量の定量化を検討した。

【結果と考察】

分子量が異なるブロック共重合体の合成を確認した。ミルテフォシンを複合化したミセルを調製し、複合化ミセルが含まれると思われる画分を³¹P-NMRによって測定したところ、ミルテフォシンのミセルへの複合化が示唆された。また、質量分析法により、標準添加法を用いることでリゾリン脂質を複合化した高分子ミセルにおけるリゾリン脂質量の定量化が可能であることが示唆された。今後は、質量分析法によって、PBS中におけるリゾリン脂質複合化高分子ミセル中の安定性やリゾリン脂質の放出挙動を評価するとともに、腸溶性高分子を用いた製剤化を検討する予定である。

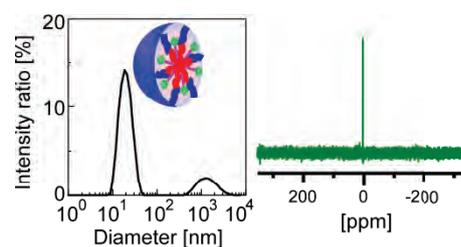


Fig. 2 Particle size distribution and ³¹P-NMR spectrum of lipid-polymeric micelles

**Development of lipid-polymeric micelle for oral drug delivery
- evaluation of formation and structure of polymeric micelles -
Ichiho Okita, Yoshihiko Murakami**

Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology
Tel/Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

自発的な核内移行性を有するナノゲルの開発と核内物質輸送特性の解析

甲南大学フロンティアサイエンス学部生命化学科

○長濱 宏治、秋山 雄大、中西 健太

【緒言】細胞核は DNA 複製や遺伝子発現など細胞運命を決定する重要な反応場であるため、細胞質から核内への物質移動は核膜孔により高度に制御されている。ポリマーゼなど核内で働くタンパク質は細胞質でインポーチンと結合し核内に輸送される。私たちの研究室では、人為的な細胞運命制御を目指し、核内への機能物質輸送手法を研究しており、インポーチンに倣った分子設計により heparin(Hep)に phenylalanine ethylester (PheEE) を結合させた両親媒性高分子を合成し、その自己組織化ナノゲルを電ポレーション法で細胞質に導入すると、核内に移行することを見出している (Figure 1)。この核移行ナノゲルをドラッグデリバリーのための薬物キャリアとして医療応用するには、①血中投与後の標的細胞周辺への集積、②標的細胞による自発的なナノゲル取り込み、③エンドソーム脱出による細胞質侵入、④核内移行、を統合的に達成する必要がある。しかし、前述のインポーチン模倣ナノゲルは細胞に取り込まれにくく、さらにはわずかに取り込まれたナノゲルはエンドソームから脱出できず、リソソームに送られ消化されることが分かった。そこで、本研究では上記②、③、④の達成を目的とし、現在のナノゲルを基盤として分子改変を行い、得られた改良型ナノゲルの自発的細胞取り込み特性、エンドソーム脱出特性、核移行性について調べた。

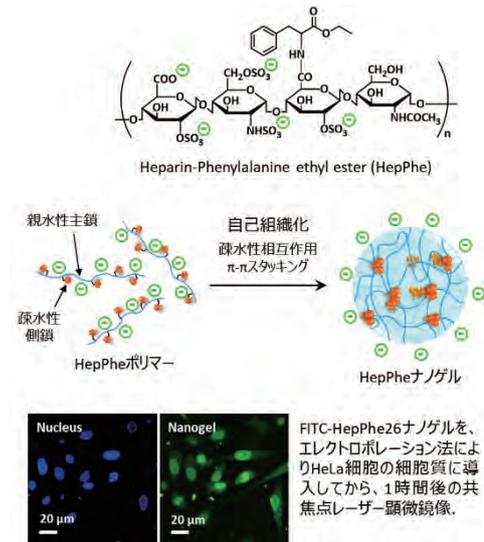


Figure 1. インポーチン模倣ナノゲルの構造および特徴

【実験】高分子主鎖を Hep から dextran (Dex) に変更し、Dex の側鎖水酸基に PheEE を化学修飾し、DexPheEE を合成した。HeLa 細胞培養上清に FITC ラベル化 DexPheEE ナノゲルを加え、細胞取り込みや細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により経時的に解析した。DexPheEE に histidine ethylester (HisEE) を結合させたキメラ型 DexPheEEHisEE を同様の方法で合成した。DexPheEEHisEE の pH 緩衝能を酸塩基滴定により調べ、エンドソーム破壊能をアクリジンオレンジアッセイにより調べた。HeLa 細胞培養上清に FITC ラベル化 DexPheEEHisEE ナノゲルを加え、共焦点レーザー顕微鏡により細胞内動態を経時的に観察した。

【結果と考察】DexPheEE ナノゲルの自発的な細胞取り込み効率は HepPheEE ナノゲルよりも高く、②は達成された。しかし、エンドソームからの脱出は見られず③と④は達成できなかった。そこで、エンドソーム脱出能の付与を目的に、プロトンスポンジ能をもつ histidine 誘導体を DexPheEE ナノゲルに結合させたキメラ型 DexPheEEHisEE ナノゲルを設計した。期待通り、DexPheEEHisEE ナノゲルはエンドソーム熟成過程の pH 低下にตอบสนองし、プロトンスポンジ効果によりエンドソーム脱出特性を示し、②と③が達成された。さらに、エンドソームから脱出した DexPheEEHisEE ナノゲルの一部は核内に移行した。つまり、DexPheEEHisEE ナノゲルは②、③、④を達成する統合的な細胞核内移行ナノキャリアであることが示された。

Design of nuclear-targeting nanogels and analysis of its nuclear transport abilities

Koji NAGAHAMA, Yudai AKIYAMA and Kenta NAKANISHI

Department of Nanobiochemistry, Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University

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

イオン液体の生体適合性の向上と DDS への応用

¹九州大学大学院工学研究院 応用化学部門, ²九州大学次世代経皮吸収センター, ³九州大学未来化学創造センター

○田原 義朗¹, 森田 佳歩¹, Md. Raihan Chowdhury¹, Rahman Md Moshikur¹, 若林 里衣^{1,2}, 神谷 典穂^{1,2,3}, 後藤 雅宏^{1,2,3}

【緒言】

イオン液体 (Ionic liquid, IL) とは常温・常圧で液体の塩 (えん) であり、通常は融点が 100℃ 以下の有機カチオンとアニオンで構成されている。1990 年代以降、水、有機溶媒に続く第 3 の液体として注目されており、高い物質溶解性と、難揮発性、高い電気伝導性などの特徴をもつ。特に難溶解性薬物を溶解する性質が明らかとなって以降、Drug Delivery System (DDS) を中心に新しいバイオマテリアルとして注目を集めている。この中で生体適合性を担保することは IL の DDS 研究において、最も重要であると考えられており、多くの生体適合性 IL が報告されている。本発表ではコリンやアミノ酸から構成される IL を用いて、疎水性抗がん剤であるパクリタクセル (PTX) の水溶化、抗炎症薬であるサリチル酸 (Sal) のイオン液体化、ペプチドの経皮デリバリーについて発表を行う。

1. PTX の水溶化

【実験】コリンとアミノ酸からなる IL を合成し、PTX の溶解性と HeLa 細胞に対する毒性について WST-8 アッセイによって評価した。得られた PTX 溶解 IL を EtOH と Tween80 によって PBS 中に溶解し、HeLa 細胞への毒性と、THP-1 細胞への感作性試験を行なった。

【結果と考察】コリン-グリシンからなる IL (Fig. 1A) が、最も高い PTX の溶解性を示し、細胞毒性も低かった。さらに PTX を溶解した IL/EtOH/Tween80/PBS は、実用化されている TAXOL と同等の HeLa 細胞への毒性を示したが、THP-1 細胞への感作性は低いという結果となった。以上より、コリン-グリシンからなる IL は生体適合性が高く、難溶解性薬物の新しい溶媒となることが示唆された。

2. Sal のイオン液体化

【実験】種々のアミノ酸エステルを合成し、細胞毒性を評価した。アミノ酸エステルをカチオン、Sal をアニオンとして IL を合成した。得られたイオン液体化 Sal について皮膚透過性を評価した。

【結果と考察】アスパラギン酸、プロリン、アラニンのエチルエステルが低い細胞毒性を示した。これらのイオン液体化 Sal は、どれも塩酸塩よりも高い皮膚透過性を示した。透過性はアスパラギン酸エチルエステル (Fig. 1B) を用いた場合が最も高く、カチオンの疎水性と相関があった。

3. ペプチドの経皮デリバリー

【実験】卵白アルブミンのエピトープペプチド (水溶性、分子量 1,400) をコリン-オレイン酸からなる IL (Fig. 1C) に溶解後、経皮吸収促進効果のある油状基剤 isopropyl myristate (IPM) に溶解した。得られたペプチドの油状製剤について皮膚透過実験を行なった。

【結果と考察】水溶性ペプチドを IL によって IPM 中に均一に分散させることに成功した。ペプチドの PBS 溶液と比較すると、IL を含む油状製剤は高い皮膚透過性を示すことが明らかとなった。

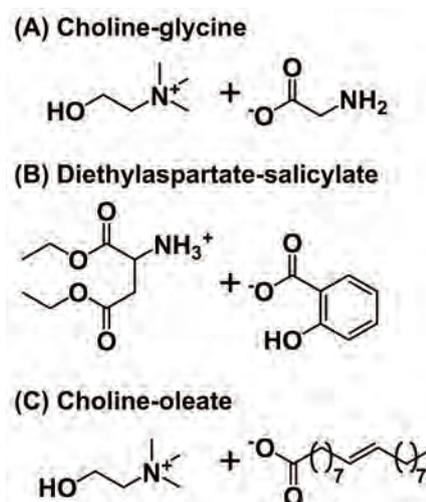


Figure 1 Structure of IL

Improvement of Biocompatibility of ionic liquid for drug delivery systems

Yoshiro Tahara¹, Kaho Morita¹, Md. Raihan Chowdhury¹, Rahman Md Moshikur¹, Rie Wakabayashi^{1,2}, Norihiro Kamiya^{1,2,3}, Masahiro Goto^{1,2,3}

¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, ²Center for Transdermal Drug Delivery and ³Center for Future Chemistry, Kyushu University

Tel: +81-92-802-2811, Fax: +81-92-802-2810, E-mail: tahara.yoshiro.181@m.kyushu-u.ac.jp

超音波応答性ナノバブルを用いた水溶性薬物の脳内送達法の開発と評価

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医薬品情報学分野

○川上 茂, 三浦 雄介, 佐藤 大樹, 淵上 由貴, 萩森 政頼

【緒言】

脳に対する外部刺激応答性薬物送達法として、超音波応答性のガスを封入したバブル製剤の血管内投与と、脳への超音波照射を組み合わせた方法が着目されている。しかしながら、薬物を効果的に脳内に送達することのできるバブル製剤や超音波照射条件の最適化は十分とはいえ、本送達法の臨床応用を実現するためには、詳細な制御因子の探索が不可欠となる。

我々はこれまで、脳マイクロダイアリシス法を用いた脳内物質の経時的な濃度の評価を行っており、本法を用いて水溶性薬物の脳内送達後の薬物動態を評価することで、効果的かつ安全な脳内薬物送達の条件を探索できると考えた。本研究では、水溶性薬物の抗がん剤モデルとして5-フルオロウラシル (5-FU) を、薬効モデルとしてアスコルビン酸を、それぞれ選択し、マウスまたはラット脳内送達後の経時的な薬物動態を評価した。さらに、超音波およびナノバブルの条件をそれぞれ変化させ、脳内薬物送達に対するそれぞれの因子の影響を評価した。

【実験】

ナノバブルは既報に従って調製した [1]。5-FU を用いた検討では、ddY 系雄性マウス (24-31 g) の尾静脈から 5-FU とナノバブルを投与後、脳に超音波を照射した。アスコルビン酸を用いた検討では、Wistar 系雄性ラット (255-290 g) の腹腔内にアスコルビン酸を、大腿静脈からナノバブルをそれぞれ投与後、脳に超音波を照射した。いずれの検討においても、大脳皮質にマイクロダイアリシスプローブを挿入し、回収した透析液を HPLC にて分析し、経時的な脳内薬物移行量を評価した。また、透析液中の抗酸化能を測定することで脳内へと移行したアスコルビン酸の薬効を評価した。さらに、5-FU を用いて超音波強度、超音波照射時間、ナノバブル投与量をそれぞれ変化させ、マウスにおける脳内移行量の変化を観察することで脳内薬物送達のための制御因子を探索した。

【結果と考察】

「1. 薬物投与のみ」「2. 薬物+ナノバブル投与」「3. 薬物投与+超音波照射」「4. 薬物+ナノバブル投与+超音波照射」の4群にて比較したところ、「4. 薬物+ナノバブル投与+超音波照射」が他の群よりも脳内薬物移行量が有意に増加した。このことから、ナノバブル投与と脳への超音波照射を組み合わせることで、水溶性薬物の脳内送達が可能になると考えられる。また、アスコルビン酸の抗酸化能も同様の群間で比較すると、脳内薬物移行量に似た経時変化を示し、薬効を維持したまま脳内へと送達されていることが示唆された。したがって、ナノバブル投与と脳への超音波照射を組み合わせると、水溶性薬物の薬効を維持したまま効果的に脳内へと送達することができると考えられる。

さらに、5-FU を用いて超音波強度、超音波照射時間、ナノバブル投与量を 3~4 段階で変化させたところ、マウス脳内薬物移行量はナノバブル投与量に応じた変化が観察された。この結果は既報とも一致するものであり、バブル製剤の投与量が脳内薬物移行における重要な因子のひとつであることが支持されたと考えられる。

[1] Suzuki, R. et al. J. Control. Release, 117, 130-136 (2007).

Evaluation of the delivery of hydrophilic drugs into the brain using ultrasound-responsive nanobubbles

Shigeru Kawakami, Yusuke Miura, Hiroki Sato, Yuki Fuchigami, Masayori Hagimori

Department of Pharmaceutical Informatics, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

Tel: +81-95-819-8563, Fax: +81-95-819-8563, E-mail: skawakam@nagasaki-u.ac.jp

セラノスティクスを志向した多機能性キレートナノメディシンの開発

¹筑波大学数理解物質系物性・分子工学専攻, ²筑波大学大学院人間総合科学研究科, ³筑波大学アイソトープ環境動態研究センター

○金 雅寛¹, 長崎 幸夫^{1,2,3}

【緒言】 金属イオンの局所濃度の調整は重要な生体機能の一つだが、薬物による制御は難しい。例えば、金属イオンの投与による抗がん治療やバイオイメージングの研究が行われているが、急性金属中毒を引き起こす恐れがあり、安全性の面で課題がある。逆に造血不全患者への反復的な輸血による鉄過剰症など、あらゆる重金属が体内に蓄積され中毒症を起こした場合は、該当金属の排出を促進させるためにキレート剤を投与するのが一般的な治療法となっている。しかし、既存のキレート剤はどれも低分子であるため、非特異的な体内分布による副作用の問題だけでなく、十分な排出促進効果を発揮できないため、長期間にわたり毎日投与する必要がある。本研究では、キレート能を有する高分子型ナノ粒子を基盤とし、体内の金属イオンの局所濃度を安全かつ迅速に制御できるシステムの構築を目指した。発表では、まず、キレート相互作用により金属イオンを封入したナノ粒子の作製、またその安定性や細胞毒性を軽減させる効果について報告する。次に、キレート能を保持させ周囲から金属イオンを捕捉するナノ粒子の作製、及びその解毒効果についても併せて報告する。

【実験】 ポリエチレングリコール(PEG)とポリクロロメチルスチレン(PCMS)からなるブロック共重合体(PEG-*b*-PCMS)を合成し、アミノ化反応によりクロロメチル基にイミノ二酢酸ジエチルを導入した後、最後にジエチル基を加水分解し、イミノ二酢酸の側鎖からなるキレート能を有した PEG-*b*-ポリキレートを作成した。この PEG-*b*-ポリキレートを水中でマンガン、鉄、銅などの金属イオンとともに混合し、キレート相互作用によって金属イオンを封入・送達するナノ粒子(図 1(a))を作製した。一方で、PEG-*b*-PCMS の側鎖にイミノ二酢酸と併せて 3-(トリエトキシシリル)プロピルアミンを導入し、トリエトキシシリル基の加水分解・縮合反応により側鎖同士が架橋した、金属イオンを捕捉するナノ粒子(図 1(b))をも作製した。目的の異なる二つのナノ粒子に対し、その安定性及び安全性の評価を行った。

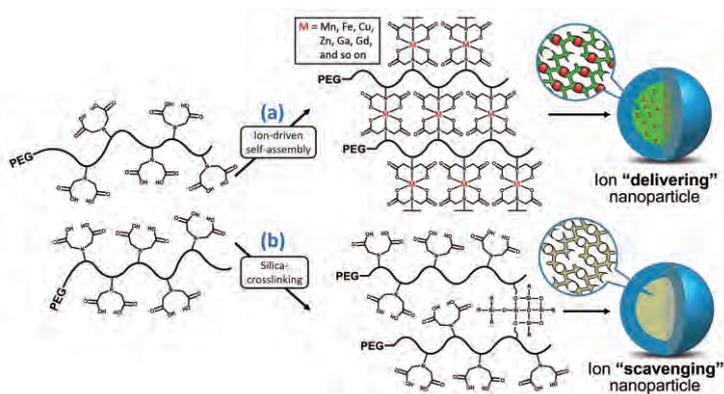


Figure 1. Schematic structure of the chelating nanoparticles

【結果と考察】 PEG-*b*-ポリキレートは両セグメントが親水性であるため、水中で複合体を形成しないが、マンガン、鉄、銅などの金属イオンとの混合により、直径 50 nm 程度のナノ粒子の形成がなされた。金属イオンを封入したこれらの非架橋型のナノ粒子に関しては、イオン強度や pH の変化により、ナノ粒子自体が崩壊すると共に、金属イオンの徐放が確認された。一方で、架橋型のナノ粒子は金属イオンの有無と関係なく、高イオン強度や酸性環境下でもナノ粒子の構造を維持し、さらに水中の金属イオンを迅速に捕捉した。動脈内皮細胞を用いた正常細胞への毒性の評価では、金属イオンを単独で暴露させるよりも、同じ濃度の金属イオンを封入した非架橋型ナノ粒子、または金属イオンと架橋型ナノ粒子を併せて暴露させた場合において、極めて高い細胞生存率を示した。これらの結果は、開発したナノ粒子が金属イオン濃度を迅速かつ安全に制御する新たなナノメディシンとして有効である可能性を示唆する。

Development of metal ion chelating nanomedicines toward multi-functional theranostics tool

Ahram Kim¹, Yukio Nagasaki^{1,2,3}

¹Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

²Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba

³Center for Research in Isotopes and Environmental Dynamics (CRiED), University of Tsukuba

Tel: +81-29-853-1002 (Ext. 8288), Fax: +81-29-853-5749, E-mail: s-ahramkim@ims.tsukuba.ac.jp

DNA タグを用いた生分解性材料表面への 種々の細胞認識素子の部位特異的固定化法の開発

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大 ORDIST, ³ 関西大医工薬連携研究センター
○住田 啓迪¹, 能崎 優太², 葛谷 明紀^{1,3}, 大矢 裕一^{1,3}

【緒言】

近年, ポリ乳酸 (PLA) 等の生分解性高分子を足場材料とした再生医療に期待が寄せられている。臓器のような階層的構造を有する組織の再生には, その構造を模倣した足場-細胞複合体を作成することが有効であると考えられる。それには, 多種の細胞認識素子を材料表面の任意の位置に導入し, 特定の細胞を足場上の望む位置に配置する技術の開発が必要である。特定の配列を有する DNA をタグとして材料の特定部位に導入できれば, それと配列特異的に結合する DNA-細胞認識素子の相補的結合により任意の場所に細胞認識素子を配置できると考えられる。PLA 材料等を成形後, 直接 DNA を化学修飾する場合¹⁾, その配置範囲を限定した異なる配列の DNA の修飾や, 固定化密度の制御が困難である。この問題は, 予め大量合成した DNA-PLA 結合体を 3D プリ

ンタやインクジェットプリンタなどを用いた手法と組み合わせて, 成形体表面に導入することで解決可能であると考えられる。一方, 我々はポリエチレングリコール(PEG)-DNA 結合体を液相法により大量合成する手法の開発に成功している²⁾。本研究では, この液相大量合成法により合成した PEG 結合 DNA と PLA をカップリングし, DNA-PLA 結合体を合成した。さらに, そのタグと特異的に結合可能な配列を有する DNA(adaptor DNA: aDNA)と細胞認識素子を結合させた aDNA-細胞認識素子結合体を用いて, DNA が細胞認識素子修飾のためのタグ-アダプターとして使用可能かどうかを材料表面上の細胞接着挙動などにより評価した(Fig. 1)。

【実験・結果および考察】

ヘテロ二官能 PEG(HO-PEG_{10k}-NH₂)を出発物とし, 水酸基にデオキシグアノシン(dG)を 3 塩基伸長した PEG-DNA 結合体(dG₃-PEG_{10k}-NH₂)を合成した。これとスクシンイミド化 PLA とのカップリング反応により, DNA-PLA 結合体(dG₃-PEG_{10k}-b-PLA_{3k})を合成した。続いて, aDNA が基盤上の DNA 部を介して結合することで, 材料表面上に aDNA が固定可能か調査した。DNA-PLA 結合体溶液を PLA フィルム表面に塗布し, これに aDNA-FAM 水溶液を接触させ, 蛍光顕微鏡観察を行ったところ, 塗布面にのみ蛍光が観測され aDNA-FAM が結合したことが確認された。さらに細胞接着性ペプチドである RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser)または REDV(Arg-Glu-Asp-Val)を結合した aDNA-ペプチドを先と同様の方法でそれぞれの PLA フィルム上に固定化した。細胞認識リガンドを RGDS とした場合は L-929 マウス繊維芽細胞に対して, 細胞認識リガンドを REDV とした場合はヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)に対して, それぞれの系での細胞接着を調査した。その結果, 各細胞に特異性を持つ aDNA-細胞認識ペプチドを固定化した場合, 塗布部に対する細胞接着性が高かったことから, 材料表面上に細胞認識ペプチドの固定化が可能であり, それを介した特異的接着が示唆された。

1) T. Matsui, H. Iwata *et al.*, *Acta Biomater.*, **2015**, *13*, 32-41.

2) S. Tanaka, A. Kuzuya *et al.*, *Chem. Asian J.*, **2017**, *12*, 2388-2392.

Development of methods for site-specific immobilization of various cell-recognition ligands on biodegradable matrices using DNAs as tags and adapters

Hiromichi SUMIDA¹, Yuta YOSHIZAKI², Akinori KUZUYA^{1,3}, Yuichi OHYA^{1,3}

(¹Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, ²ORDIST and ³CEMP, Kansai University, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan)

¹Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

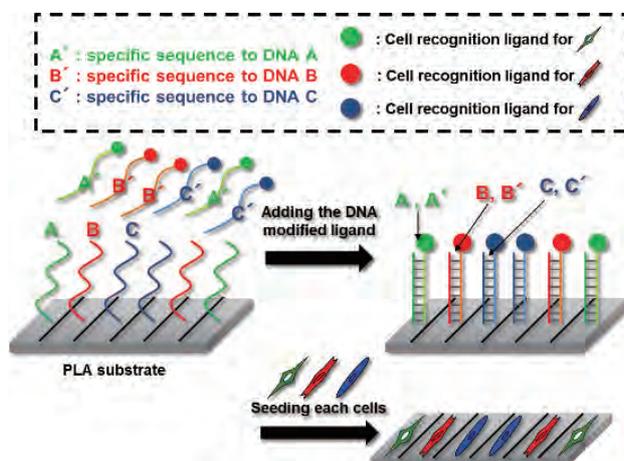


Fig 1. Preparation of PLA surface immobilizing various cell-specific ligands at desired areas using complementary DNAs as tag/adaptor.

パターン化培養に向けた異なる温度応答性高分子コーティングによる細胞接着温度の制御

¹東理大院基礎工, ²東女医大先端生命研

○知念 宙^{1,2}, 中山 正道², 菊池 明彦¹, 大和 雅之², 岡野 光夫²

【緒言】機能性高分子を培養表面に導入することで、細胞の接着挙動を制御する手法が注目されている¹⁾。なかでもナノ薄膜状の poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) (水中の下限臨界溶液温度, LCST: 32°C) 修飾表面では LCST を挟む温度変化で細胞の接・脱着を非侵襲的に制御できる²⁾。近年、パターン化温度応答性表面を利用した生体組織を模倣した機能性細胞シートの作製を検討している³⁾。従来のパターン化温度応答性表面の作製では、フォトリソグラフィを併用した部位選択的で多段階の化学反応を含む煩雑な操作が必要である³⁾。そこで簡便な温度応答性表面の作製法として高分子の物理吸着法に着目した。poly(*n*-butyl methacrylate) (PBMA) を疎水性アンカー鎖として導入した PNIPAAm 含有ブロック共重合体を表面に物理吸着することで、水中で安定な温度応答性表面の構築を達成した⁴⁾。本研究では簡便にパターン化温度応答性表面を作製するための基礎検討として、相転移温度の異なる温度応答性高分子含有ブロック共重合体を物理吸着させ、温度応答性高分子の物性が表面特性と細胞接着挙動に及ぼす影響を明らかにすることを目的にした。LCST の異なる温度応答性高分子, PNIPAAm, poly(NIPAAm-co-*N*-*tert*-butylacrylamide) (PNIPAAm-*t*BAAm) を PBMA にそれぞれ連結したブロック共重合体を物理吸着により導入した培養表面の細胞接着挙動を解析した。

【実験】RAFT 重合により, PBMA (98 量体) と PNIPAAm (258 量体) または P(NIPAAm-*t*BAAm) (216 量体, 7.4mol% *t*BAAm 含有) のブロック共重合体 (B-IP または B-IP/*t*B) を得た。これらを acetonitrile/DMF (5/1 v/v) に 0.3w/v% で溶解し, TCPS 上にそれぞれスピンドコーティングした。温度応答性高分子鎖の LCST は, 同様に合成した PNIPAAm と P(NIPAAm-*t*BAAm) を培養液中に溶解し, 温度変化にともなう 700 nm の透過率変化から決定した (LCST: 透過率 50% となる温度)。ウシ血管内皮細胞を播種し, 各培養表面の表面物性と温度が細胞接着性に及ぼす影響を検討した。

【結果と考察】29°C では B-IP および B-IP/*t*B 表面ともに良好な細胞接着性を示したが, 28°C では B-IP 表面のみ顕著に細胞接着性が低減した (Fig. 1)。培養液中の PNIPAAm の LCST は 27.9°C であり, 28°C では細胞接着を誘起するほど高分子鎖の脱水和が進行しなかったためと考えられた。これに対し, 25.3°C に LCST を示す P(NIPAAm-*t*BAAm) は, 28°C で細胞が接着するのに十分な脱水和状態であったと考えられた。このことより, LCST の異なる温度応答性高分子を物理コーティングすることで細胞の接着開始温度を制御できることが明らかとなった。また本発表では, ポリジメチルシロキサン製スタンプを利用した高分子パターンニングについても報告する。

各ブロック共重合体を任意形状でパターン化した表面を構築し, LCST の違いにより多段階で播種することで, 異種細胞の共培養とその細胞シート化の実現が期待される。

【参考文献】1) N. Oleszko *et al.*, *Biomacromolecules*, **2015**, *16*, 2805-2813. 2) N. Yamada *et al.*, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1990**, *11*, 571-576. 3) H. Takahashi *et al.*, *Biomacromolecules*, **2011**, *12*, 1414-1418. 4) M. Nakayama *et al.*, *Macromol. Biosci.*, **2012**, *12*, 751-760.

Controlled cell adhesion temperatures via polymer coating of variant thermoresponsive polymers for patterned cell culture.

Hiroshi CHINEN^{1, 2}, Masamichi NAKAYAMA², Akihiko KIKUCHI¹, Masayuki YAMATO² and Teruo OKANO² (¹Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci., 6-3-1 Nijjuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan, ²Inst. Adv. Biomed. Eng. & Sci., Tokyo Women's Med. Univ. (TWIns), 8-1 Kawadacho, Shinjuku, Tokyo 162-8666, Japan)

²Tel: +81-3-3353-8112 (Ext. 43215), Fax: +81-3-3359-6046, E-mail: nakayama.masamichi@twmu.ac.jp

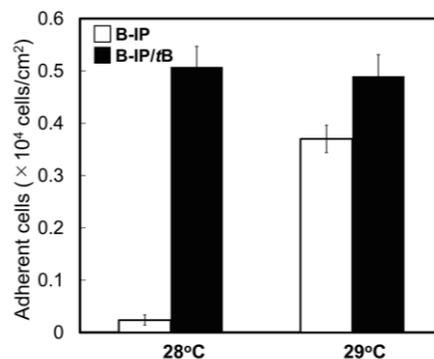


Fig. 1 Temperature-dependent cell adhesion on B-IP/*t*B and B-IP surface. Cell seeding density: 1 × 10⁴ cells/cm², culture period: 24 h, mean ± SD (n=3).

3D 足場材料としての単層 β -ヘアピンペプチド水ドロゲルの設計

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大先端機構
 ○横川亮祐¹・轟 文希¹・柿木佐知朗^{1,2}・平野義明^{1,2}

【緒言】 一般的な β -シート構造は疎水性面と親水性面に分かれ、疎水性面同士の疎水性相互作用によって二層以上で構造が安定している。しかし、Koide らは、ライム病ボレリア菌に含まれる表層タンパク質 A (OspA) には単層の β -シート構造が存在し、さらにその β -ヘアピン領域を同じ配列で拡張しても安定していることを明らかにしている¹⁾。単層で構造が安定している天然タンパク質由来の β -シート構造はとても珍しくあまり研究されていない。そこでこの単層 β -シート構造の β -ヘアピン領域を模倣しペプチド水ドロゲルへの可能性と他のペプチド水ドロゲルの物性および細胞培養後の細胞の挙動について検討することを目指した。

本研究では、拡張された β -ヘアピンの配列を模倣した β -ヘアピンペプチド KSSTEEKFNEKGELS EKKITRA (KSS) と、模倣配列のターン部分にアミノ酸の性質を変えずにターン構造をとり細胞接着性をもつ RGD 配列を組み込んだペプチド KSSTEEKFNERGDLSEKKITRA (KSSRGD) を設計した。これらのペプチドの二次構造の解析を行い、ゲル化と細胞挙動について検討を行った。

【実験】 β -ヘアピン部分の配列を模倣したペプチド (KSS) と、KSS のターン部分に細胞接着性を示す RGD 配列と置き換えたペプチド (KSSRGD) を Fmoc 固相合成法で合成した。次に合成したペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS) で分子量を確認した。この 2 つのペプチドの構造を赤外吸収 (FT-IR) 分光法、円二色性 (CD) 分光法を用いて解析した。ゲル化の検討を行うためにゲルの作製方法を検討し、レオロジー測定を行いゲルの機械的特性を評価した。

【結果と考察】 KSS について、FT-IR スペクトルより主に β -シート構造を形成していることがわかった。しかし CD スペクトルではランダムコイル構造を示していた。また KSSRGD についても KSS 同様、ランダムコイル構造に近い CD スペクトルのパターンを示した。これは元来、単層 β -シート構造を示すペプチドであったために低いペプチド濃度では分子間相互作用が弱く β -シート構造を形成しにくいと考えられる。そこでペプチド濃度を高くしたところの KSS および KSSRGD 溶液では共に負のコットン効果が高波長側にシフトする CD スペクトルのパターンを示していた (Fig.1)。この結果はランダム構造から β -シート構造の形成についてはペプチド濃度に支配されることが明らかになった。以上より、ゲル化にはペプチド濃度の検討が必要であることが示唆された。ゲルの作成方法及び物性については学会で報告する。

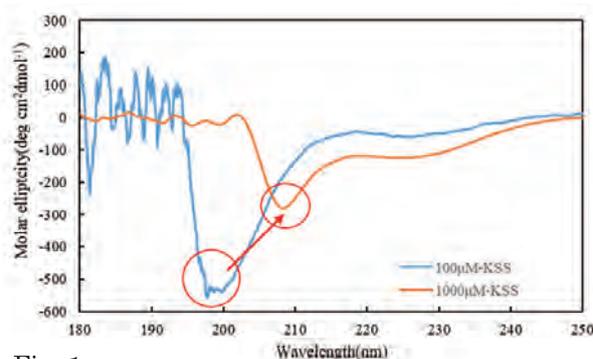


Fig. 1
 CD spectra of 100 μ M and 1000 μ M KSS in H₂O

【参考文献】 1) Shoe Koide, et. al., *Nature*, **403**, 456-460 (2000).

Design of single β -hairpin peptide hydrogel as 3D scaffold

Ryosuke YOKOKAWA¹, Ayaki JO¹, Sachiro KAKINOKI^{1,2}, Yoshiaki HIRANO^{1,2}

¹Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, ²Kansai University, Organization for Research and Development of Innovative Science and Technology

Tel: 06-6368-0974, e-mail: yhirano@kansai-u.ac.jp

細胞パターンニング基材の開発を目的とした光応答性ポリマーフィルムの創製

¹ 関西大学化学生命工学部, ² 関西大学 ORDIST

○東野 美玲¹, 野口 貴史¹, 河村 暁文^{1,2}, 宮田 隆志^{1,2}

【緒言】細胞が増殖・分化する際、周囲のマトリックス空間が細胞の足場として働くため、細胞工学や組織工学において細胞を制御するためには最適な細胞周辺環境の構築が重要となる。また、細胞は周辺環境の化学的性質だけでなく物理的性質を認識し、自らの伸展や分化といった挙動を変化させる。そこで、外部刺激により細胞培養基材の表面物性を変化させることができれば、空間的に細胞の接着挙動を制御できる細胞培養基材の開発が可能になると期待できる。本研究では、光照射部位のみで体積変化する光応答性ポリマーフィルムを創製し、光照射後のフィルム表面の物理的性質変化を調べた。さらに、ポリマーフィルム上での細胞挙動を調べ、細胞パターンニング基材への応用について検討した。

【実験】光二量化基を有する2-シンナモイルオキシエチルメタクリレート (CEMA) と大きな自由体積を有するポリジメチルシロキサン (PDMS) マクロモノマーとの共重合により PCEMA-g-PDMS を合成した。合成した PCEMA-g-PDMS をスピニング法によりフィルム化にした後、格子状のフォトマスクを通して UV 光を照射してフィルム表面に格子状のパターンを形成させた。このパターン化したフィルム上にマウス線維芽細胞 (L929) を播種し、その細胞接着挙動を観察した。さらに、原子間力顕微鏡 (AFM) のフォースカーブ測定によりフィルム表面の弾性率を測定した。

【結果と考察】 Fig. 1 には、光照射によりパターンを形成したフィルム表面に L929 を播種して、3 日後の位相差顕微鏡画像および光照射後の弾性率分布を示した。CEMA/PDMS = 45/55 であるフィルム上では明確な細胞パターンを確認することができ、光未照射部位に細胞が優先的に接着した。また、光照射部位と未照射部位とで明確な弾性率差が生じていることがわかる。これは、光照射部位のみでシンナモイル基が二量化し、高分子鎖間で架橋構造が形成されるため、光照射部位の弾性率が増加したと考えられる。さらに、細胞は弾性率がより低い部位に優先的に接着していることがわかった。しかし、CEMA/PDMS = 87/13 であるフィルム上ではパターンを施した表面にも関わらず細胞接着では明確なパターンが確認できなかった。また、光照射部位と未照射部位とで明確な弾性率差は認められなかった。CEMA/PDMS = 87/13 のフィルムは大きな自由体積を有する PDMS 成分の含有量が少ないため、光架橋による自由体積の減少量が小さくなり、明確な弾性率差が生じなかったと考えられる。したがって、細胞はフィルム表面の凹凸ではなく弾性率を認識して接着するために、細胞パターンニングが可能であることが示唆された。

以上の結果より、細胞は光未照射部位に選択的に接着し、PCEMA-g-PDMS フィルムは細胞挙動を制御できる細胞培養基材としての応用が期待できる。

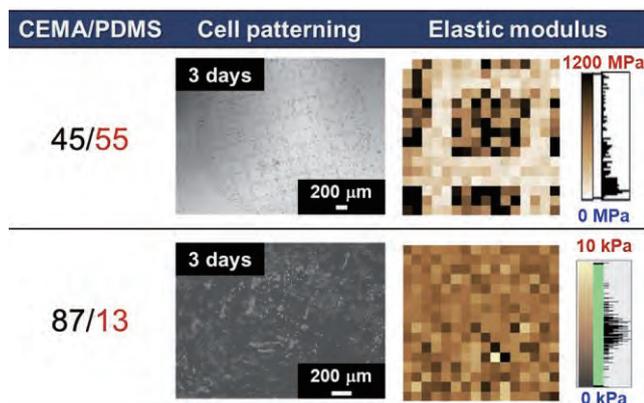


Fig. 1. Adhesion of L929 cells onto PCEMA-g-PDMS films surface-patterned by UV irradiation through a photomask and elastic modulus of their film surfaces.

Preparation of Photo-responsive Polymer Films for Development of Cell Patterning Substrates

Misato Higashino¹, Takafumi Noguchi¹, Akifumi Kawamura^{1,2}, Takashi Miyata^{1,2}

¹Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering and ²ORDIST, Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan. Tel: +81-6-6368-0949, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: tmiyata@kansai-u.ac.jp

生分解性アルデヒド導入セルロースを用いた足場材料に関する研究

北陸先端大院マテリアル
○袁喜達・松村和明

【緒言】

セルロースは地球上最も豊富な天然ポリマーで、生体適合性、生分解性、再生可能なバイオマテリアルである。ただし、セルロースは人体内では分解できない。我々はマラプラード酸化反応を介して多糖類にアルデヒドを導入し、アミノ基と反応させることで分解が起こることを見出した^[1]。これによって、セルロースを含む多糖類に生体内分解性を付与することに成功した。更にアルデヒド導入したセルロースを凍結乾燥を行い、多孔質構造を得た。アルデヒド導入率により、酸化セルロースの分解速度や凍結乾燥した酸化セルロースの内部構造を変化させることが可能であった。本研究ではアルデヒド導入セルロースの細胞足場材料への応用について検討した。

【実験】

セルロースパウダーを各濃度 (1、3、5、10、15%) の過ヨウ素酸ナトリウム水溶液中で反応させ、ヨウ素滴定法を用いてアルデヒド導入率を調べた。また酸化セルロースを凍結乾燥し、各濃度 (1、3、5、10、15%) のグリシン水溶液中に浸漬し、アミノ基との反応に伴う溶解状況を観察した。以下酸化セルロースは、CPX-Y と表記し、X は過ヨウ素酸濃度、Y は浸漬したグリシン濃度を示す。生成物を動的光散乱、走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) などの装置を用いて観察した。また、広角 X 線回折 (XRD) で各段階の反応物と生成物の結晶構造を調べた。酸化セルロースを細胞培養液に浸漬し、細胞培養の足場材料としての可能性を検討した。

【結果と考察】

ヨウ素滴定法の結果、過ヨウ素酸ナトリウムの濃度の増加とともに、酸化セルロースのアルデヒド導入量が増加した。アルデヒド導入率はコントロールできた。また XRD 測定の結果、セルロースの結晶構造は、過ヨウ素酸ナトリウムおよびグリシンとの反応により大きく変化していないことがわかった。図 1 と図 2 に

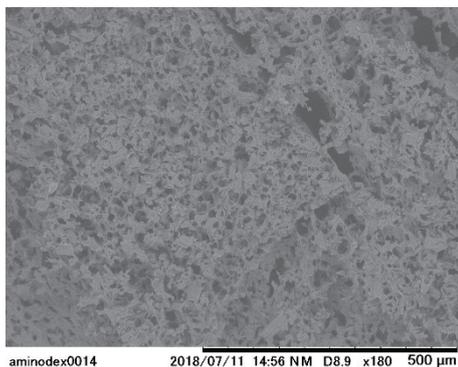


Fig1. SEM photograph of freeze-dried CP12

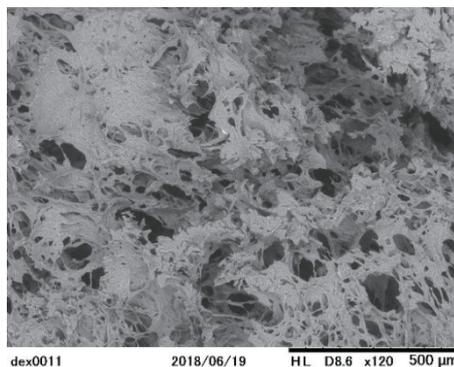


Fig2. SEM photograph of freeze-dried CP15

12%と15%過ヨウ素酸ナトリウム溶液で酸化セルロースを凍結乾燥したサンプルのSEM観察像からわかるようにポーラスな構造が観察された。そして、アルデヒド導入率の増加とともに、小孔のサイズ増大することが判明した。凍結乾燥したCP-12を細胞培養液に浸漬し、溶解状況を観察した結果、約一週間形を保つことができた。今後凍結乾燥した酸化セルロースに細胞を接種し、足場材料としての応用を試みる。

【参考文献】

1. Chimpibul W. et al., J. Polym. Sci. A. 54, 2254-2260 (2016)

Degradation control of aldehyde-introduced cellulose

Xida YUAN, Kazuaki MATSUMURA, (School of Material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1211, Japan)

Tel: +81-7-6151-1680, E-mail: mkazuaki@jaist.ac.jp

高濃度化で発現した哺乳類コラーゲンの感熱応答挙動の解析

¹大阪大学大学院工学研究科, ²先端細胞制御化学 (TOPPAN) 共同研究講座, ³JST さきがけ
○湯川 優一¹, 中辻 博貴^{1,2}, 入江 新司², 松崎 典弥^{1,2,3}

【緒言】ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) に代表される感熱応答性高分子は、温度に依存した水和と脱水により相転移を示す高分子であり [1]、医療材料として幅広く研究されている。天然由来の感熱応答性高分子として、これまで、PNIPAAm 修飾ゼラチン [2] や、プロピル化ポリ (γ-グルタミン酸) [3] などが報告されているが、医療分野への応用を考えた場合、合成高分子の使用は細胞毒性などが懸念される。そこで、完全天然型の感熱応答性高分子を作製できれば、医療や創薬分野など幅広い応用が期待される。我々は最近、ブタ皮膚由来 I 型コラーゲンを細断化したコラーゲンマイクロファイバー (CMF) が、ゲル化とゾル化を可逆的に示すことを見出した (Figure 1)。本発表では、その感熱応答性のメカニズムと応用を報告する。

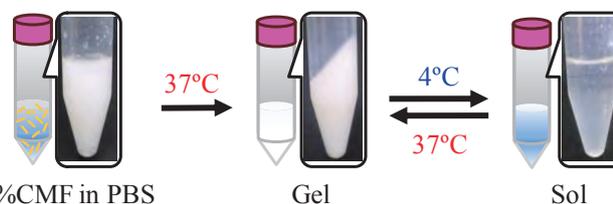


Figure 1. Schematic illustration of the thermo-sensitive collagen microfiber (CMF) solution. The solution shows repeatable gelation at 37°C and solation at 4°C.

【実験】50 mg のブタ皮膚由来 I 型コラーゲン (日本ハム (株) より提供) を 5 mL の 10 倍濃度 PBS 中で細断し、CMF を得た後、PBS 中で懸濁させた。それを 3 日以上冷蔵して CMF 溶液を得た。その溶液を 37 °C と 4 °C で往復させ、その間の透過率の変化を測定した。

【結果と考察】作製した CMF 溶液の 37 °C と 4 °C での透過率変化を Figure 2 に示した。比較として、市販 (ニッピ株式会社) のコラーゲンゲルも同様の実験を行った。市販のコラーゲンゲルの透過率は、温度を変化させてもほとんど変化なく約 10%であったが、CMF 溶液は、2, 3, 5 wt%すべての濃度で 4 °C と 37 °C で透過率が約 90%から 0%まで大きく変化し、ゾル-ゲル転移を示した。この結果より、市販のコラーゲンゲルは感熱応答性を示さないのに対し、CMF 溶液は感熱応答性を示すことが確認された。

また、CMF 溶液の相転移温度を評価するため、1 °C/min の昇温および降温条件で透過率を測定した。その結果、ゲル化温度は 36 °C、ゾル化温度は 5 °C であった。

[1] J. E. Guillet *et al.*, *J. Macromol. Sci. Chem.* **1968**, 2, 1441. [2] T. Matsuda *et al.*, *Tissue Eng.* **2003**, 9, 371. [3] T. Shimokuri *et al.*, *J. Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 407.

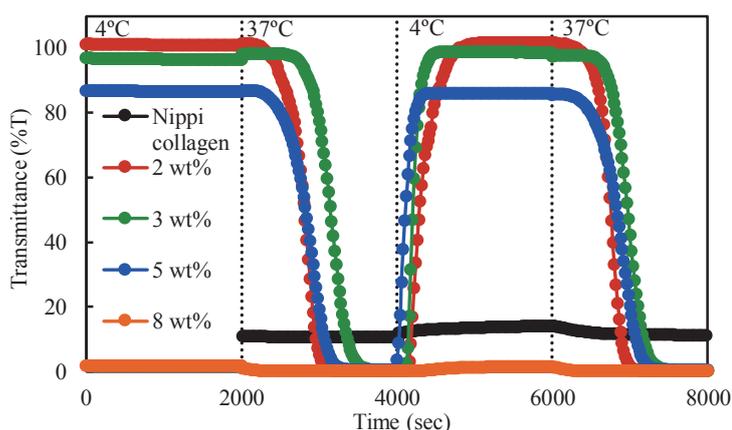


Figure 2. Transmittance of 2-8 wt% CMF solutions and Nippi collagen solution.

Thermo-responsivity of mammalian collagen expressed at high concentration

Yuichi YUKAWA¹, Hirota NAKATSUJI^{1,2}, Shinji IRIE² and Michiya MATSUSAKI^{1,2,3}

¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN ²Joint Research Laboratory (TOPPAN) for Advanced Cell Regulatory Chemistry ³JST-PRESPO

¹Tel: +81-6-6879-7357, Fax: +81-6-6879-7359, E-mail: m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

β -グルカンを用いた細胞分化誘導の抑制

¹北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科
○野上 知徳¹, 櫻井 和朗¹, 望月 慎一¹

【緒言】

近年、高齢化が進むにつれて骨粗鬆症などの骨疾患は増加傾向にあり現代社会の大きな問題である。骨疾患の早期原因究明・新規治療薬の開発が望まれている。正常な骨形成では、骨の形成と吸収がバランスよく行われている。しかし、このバランスが崩れ破骨細胞による骨の吸収が骨形成よりも過剰に行われると骨は脆くなり、骨粗鬆症へと発展する。そこで、破骨細胞の抑制をすることは非常に重要な課題である。その抑制手段として、 β -グルカンに注目した。先行研究では、破骨細胞を6日間培養し一つのサンプルには β -グルカンの一つであるカードランを添加し培養が行われた。その結果カードランの添加なしのものでは破骨細胞の分化が行われたが、Curdlanを添加したものでは破骨細胞の分化が抑制された。しかしカードランは親水性ではないためこの実験では強塩基性溶媒であるNaOHに溶解して添加が行われた。そこで生体内と同様に中性溶媒中での破骨細胞の分化抑制を行うために、中性溶媒に可溶性のカードランを作製する必要がある。本研究ではこの不溶性のカードランにカルボン酸を修飾させ可溶性のカードランを作製し物性評価を行い、可溶性のカードランが破骨細胞の分化を抑制するのかを調べた。

【実験】

カードランへのカルボン酸の導入はTEMPO酸化を用いた。TEMPOとは2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシラジカルの略語であり、非常に安定に存在しているフリーラジカルである。第一級アルコールを選択的にアルデヒドへと酸化させる性質を持つ。TEMPOによってアルデヒド基を導入後、亜塩素酸ナトリウムにより酸化を行いカルボン酸の導入を行った。その後、各検出器により物性評価を行った。

【結果と考察】

IR測定によってカルボキシル基の導入を確認した。IR測定とは赤外領域のエネルギーを与えることで、化学結合の振動が生じ、このとき吸収された赤外線エネルギー量を測定することで化学結合の種類(官能基)を知ることができる。解析に用いたサンプルはTEMPO酸化反応開始後24時間後のサンプルと48時間後の2つのサンプルの測定を行った。この二つのサンプルのIR測定を行った結果を見ると大きく異なった点は 1700cm^{-1} 付近に見られた(図1)。吸収位置を見ると、24時間から48時間になるにつれて 1720cm^{-1} 付近のピークが 1600cm^{-1} 付近にシフトしていることがわかる。この関係する官能基の特性吸収波長を調べるとアルデヒド基は 1740cm^{-1} から 1720cm^{-1} 付近に特性吸収波長がありカルボキシル基は 1610cm^{-1} から 1550cm^{-1} に特性吸収波長が現れる。これは側鎖のアルデヒド基が反応が進みカルボキシル基になりピークが移動し、カルボキシル基の導入ができたとわかった。この48時間のものを水に溶かすと瞬時に溶けた。このことからカルボキシル基の修飾により親水性が向上したことが見られた。さらに修飾率と分子量を形状の評価を行った。

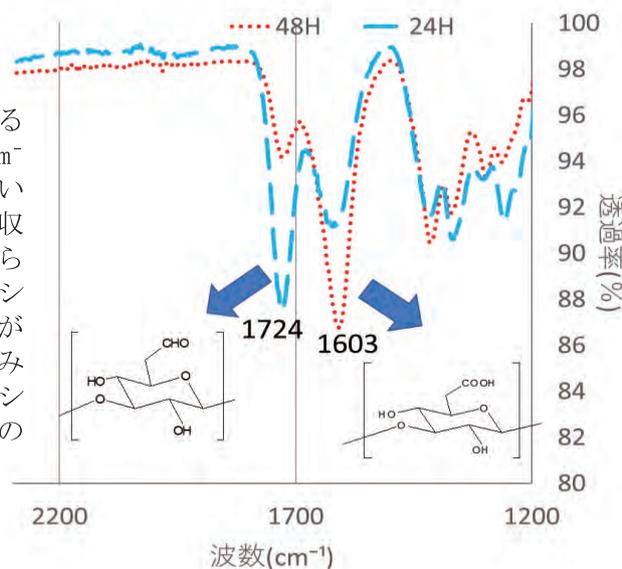


図1, IR測定結果

Biomaterials: Suppression of cell differentiation induction using β -glucan

Tomonori Nogami¹, Kazuo Sakurai¹, Shinichi Mochizuki¹

¹Graduate School of Environmental Engineering, ¹Graduate Programs in Environmental Systems, ¹The University of Kitakyushu

Tel: +81-093-695-3310, E-mail: admin-sec@kitakyu-u.ac.jp

セルロースオリゴマーからなるクリスピーゲルの一段階調製と三次元細胞培養への応用

東京工業大学物質理工学院

○前田 亨, 澤田 敏樹, 芹澤 武

【緒言】セルロースやキチンといった構造多糖は、自身の高い結晶性に起因して、天然では物理化学的に安定な組織体を形成している。それらの集合化を自在に制御することができれば、高い安定性をもつ優れた自己組織化材料として利用できると期待されるが、その制御は一般に困難である。近年では、酵素反応を利用することで人工的にセルロースの集合構造を制御し、多様な構造や機能をもつセルロース集合体を構築できることが報告されている。我々は加リン酸分解酵素を用いた合成系において、プライマー（糖アクセプター）の誘導体化や反応条件の適切な選択により、生成したセルロースオリゴマーがその場で自己組織化して、反応液がゲル化することを見出している。しかしながら、反応温度や溶媒などが酵素の活性を維持できる条件に限られている点や、ゲルを利用するには精製が必須である点が問題となっている。そこで本研究では、あらかじめ酵素合成したセルロースオリゴマーを結晶化を駆動力として水溶液中で自己組織化させ、酵素合成に依存することなくハイドロゲルを一段階で調製する手法を確立すること、また、三次元細胞培養のマトリックスとしてのそれらの利用可能性を明らかにすることを目的とした。

【実験】酵素合成したセルロースオリゴマーを水酸化ナトリウム水溶液に溶解させた後に塩酸で中和し、25 °C で静置した。生成物を超純水で精製し、凍結乾燥して特性を評価した。種々のタンパク質と生成物の分散液を混合し、タンパク質の吸着量を評価した。さらに、中和後の反応溶液と細胞懸濁液を混合して 37 °C で所定時間インキュベーションした。光学顕微鏡により細胞の形態を観察し、生細胞を Calcein-AM、死細胞を Propidium Iodide で染色して蛍光顕微鏡で観察することで細胞の生死を判定した。

【結果と考察】あらかじめ酵素合成したセルロースオリゴマーを水酸化ナトリウム水溶液に溶解させ、塩酸で中和した結果、無色の生成物が溶液全体に観察され、一定濃度以上ではハイドロゲルとなった。走査型電子顕微鏡（SEM）観察から、このハイドロゲルは高度に成長したナノリボン様の構造体がネットワークを形成することで構築されていることがわかった（Figure 1）。このハイドロゲルは、自立するものの機械的刺激により容易に崩壊させて分散液とすることができることから、クリスピーゲルと命名した。

本ゲルの三次元細胞培養のマトリックスとしての利用可能性を明らかにするため、自己組織化したセルロース集合体へのタンパク質の吸着特性を評価した。その結果、様々なタンパク質がセルロース集合体に吸着することではなく生理的に不活性な材料であることが示唆された。実際に、血清培地中で自己組織化させた結果、タンパク質や無機塩など様々な分子が共存する溶液中であってもハイドロゲルを形成できることがわかった。そこでゲル内部に HeLa 細胞を封入して培養した結果、五日間培養した後も細胞はよく生存しており、また細胞が増殖・凝集してスフェロイドを形成した。このスフェロイドは、ゲルに機械的刺激を加え分散液とした後にろ別することで容易にマトリックスと分離して回収することができた。以上の結果から自己組織化により得られるセルロース系ハイドロゲルが生理的に不活性で取り扱い容易な三次元細胞培養マトリックスとして有用であることを見出した。



Figure 1. SEM image of the xerogels prepared by lyophilization of the hydrogels. Inset: Photo of the hydrogel.

Single-step preparation of crispy gels composed of self-assembled cellulose oligomers and their application to 3D cell culture

Tohru MAEDA, Toshiki SAWADA, Takeshi SERIZAWA (Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1-H121 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan)

Tel&Fax: +81-3-5734-2128, E-mail: serizawa@polymer.titech.ac.jp

単層/スフェロイド培養における間葉系幹細胞の特性比較

北九州市立大学

○徳永 優斗, 宮本 大輔, 中澤 浩二

【緒言】

体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞は、骨や軟骨、血管、心筋などの再生医療の細胞源として期待されている。一方で、培養基材から回収された細胞を移植する場合、分散状態では細胞の機能や生着率の低下、移植部位への細胞保持が難しいことが指摘されている。このような問題点を解決する方法として、近年では細胞の三次元組織化技術が注目されており、細胞シート技術はその代表例として知られている。

このような背景のなか、我々は三次元組織化培養の一種であるスフェロイド(球状細胞組織体)を均質かつ大量に形成できる技術を確立しており、間葉系幹細胞スフェロイドを移植治療へと展開する試みを進めている。その基礎研究として、本研究では単層(二次元)培養とスフェロイド(三次元)培養における間葉系幹細胞特性の比較を行った。

【実験】

スフェロイド培養デバイスとして、独自のマイクロウェルチップ技術を利用した。このチップは、培養基板上に数百ミクロンの微小空間(マイクロウェル)が規則的に多数配置され、その表面をポリエチレングリコールで修飾することによってマイクロウェル内でスフェロイド形成を促進する構造となっている(図1)。

また、二次元単層培養には組織培養ディッシュを利用した。これらの培養デバイスにヒト骨髄由来間葉系幹細胞株であるUE7T-13細胞を播種し、両培養系における細胞特性を比較した。

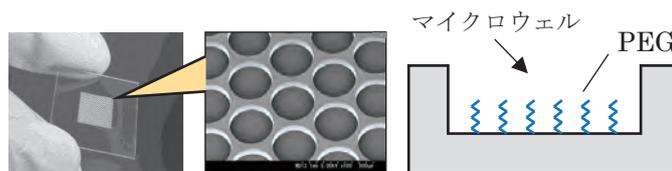


図1. マイクロウェルチップ

【結果と考察】

単層培養では、組織培養ディッシュ底面に接着した細胞が平面方向に伸展し増殖した。スフェロイド培養では、マイクロウェル内に保持された細胞が自発的に集合・凝集化し、播種後数時間内にスフェロイドを形成した(図2)。また、一つのウェルには1個のスフェロイドが形成され、スフェロイド形態を維持したまま少なくとも一週間以上培養が可能であった。

細胞増殖能を比較した結果、単層培養では培養日数の経過に伴って細胞数が増加したが、スフェロイド培養では培養日数の経過とともにスフェロイドサイズや細胞数の減少がみられた。これらの結果から、間葉系幹細胞の増殖には細胞-基材間を介した接着刺激が強く作用していることが考えられる。

培養7日目において、間葉系幹細胞の分化能をマーカー遺伝子の発現によって比較した。スフェロイド培養における骨分化・脂肪分化・軟骨分化マーカー遺伝子の発現は、単層培養よりも優位に高く、三次元組織化によって間葉系幹細胞の分化が促進される傾向にあるが示された。

これらの結果から、二次元と三次元の細胞形態の違いは、間葉系幹細胞の増殖能や分化能などの細胞特性に変化を与えることが明らかとなった。

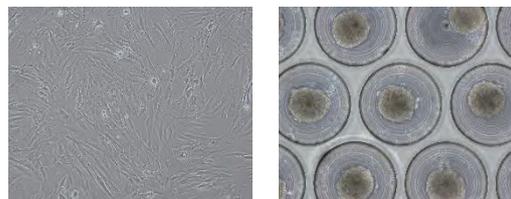


図2. 単層/スフェロイド培養の間葉系幹細胞

Characteristics comparison of mesenchymal stem cells in monolayer and spheroid cultures

Yuto TOKUNAGA, Daisuke MIYAMOTO, and Kohji NAKAZAWA

Department of Life and Environment Engineering, The University of Kitakyusyu

Tel: +81-93-695-3292, Fax: +81-93-695-3359, E-mail: nakazawa@kitakyu-u.ac.jp

表面修飾したジルコニア上における脂肪由来間葉系幹細胞の細胞挙動評価

¹ 早稲田大学理工学術院, ² 産業技術総合研究所健康工学研究部門, ³ 産業技術総合研究所電子光技術研究部門

○矢野 玄¹, 橋本 祥吾¹, 安永 菜由², 廣瀬 志弘², 欠端 雅之³, 屋代 英彦³, 山崎 淳司¹, 伊藤 敦夫²

【緒言】

細胞の足場となる生体材料の表面性状は細胞の接着、増殖、分化などの基本的な細胞挙動に影響を与えることがわかりつつあり、それらの相関関係やそのメカニズムを明らかにすることで、高機能生体材料の開発の促進が期待される。これまでに我々は、ハイドロキシアパタイトおよびジルコニアの表面性状が骨髄由来間葉系幹細胞(BMDMSC)の初期細胞接着に影響を与え、初期細胞接着面積と骨分化能に逆相関があることを見出した。そこで本研究では、ジルコニアの表面性状が由来の異なる間葉系幹細胞においても、その初期細胞接着とその後の骨分化能に影響を及ぼすかを検証するため、脂肪由来間葉系幹細胞(ADMSC)を用いて、フェムト秒レーザーで表面修飾したジルコニア上での初期細胞接着について評価したので報告する。

【実験】

鏡面研磨したイットリア安定化正方晶ジルコニア多結晶体(3Y-TZP) [原料粉体 TZ-3YB-E(イットリア添加量 3mol%)、東ソー]にフェムト秒レーザー (中心波長 810 nm、パルス幅 80 fs) を数十パルス照射しレーザー誘起表面周期構造(LIPSS)を形成させ、レーザー光や衝撃による劣化の無いものを細胞実験に使用した。レーザーによる表面修飾で、ジルコニア表面には楕円状クレーター (長軸 90 μm 短軸 60 μm 深さ約 8 μm) が規則配列している、さらにクレーター内面には深さ 400nm の直線状の溝が 918nm 周期でほぼ平行に配列した LIPSS がある。ADMSC は F344/NS1c ラット (7 週令、オス) より単離し、脂肪細胞への分化能を Oil Red O 染色により確認したものを使用した。初期細胞接着への影響を解析するため表面修飾しない 3Y-TZP (3Y-TZP (-))、表面修飾した 3Y-TZP (3Y-TZP (+)) および Tissue Culture Polystyrene (TCPS) 上に ADMSC を播種し、3 時間培養後、細胞を固定し、細胞骨格を rhodamine phalloidin、核を CYTO 16 green fluorescent nucleic acid stain で二重染色した。得られた蛍光顕微鏡画像を用いて、画像解析ソフト (Image Pro PLUS) により、細胞接着面積を測定した。

【結果と考察】

3Y-TZP (-) 上での細胞接着面積は TCPS 上と比較して、有意に大きく、初期細胞接着は材料による影響を受ける可能性が示唆された (図 1)。また、3Y-TZP (+) 上での細胞接着面積は 3Y-TZP (-) 上および TCPS 上と比較して、有意に小さくなることを見出した (図 1)。さらに、3Y-TZP (+) 上の細胞を観察すると、ADMSC が LIPSS 底面から約 9 μm の高さの場所 (楕円状クレーターの最上部に相当) を足場に接着している様子が観察された。以上の結果より、BMDMSC と同様に、由来の異なる ADMSC においても材料の表面性状が初期細胞接着に影響を与える可能性が示唆された。現在、初期細胞接着面積と細胞分化の相関性について、ADMSC の骨および脂肪細胞への分化能を指標に検証している。

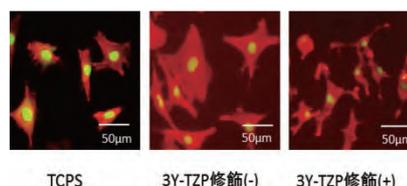


図 1. 各材料上における ADMSC の蛍光顕微鏡画像
赤色：細胞骨格、緑色：核

Evaluation of cellular behaviors of Adipose-derived mesenchymal stem cells with zirconia ceramics modified by femtosecond laser

Gen Yano¹, Shogo Hashimoto¹, Mayu Yasunaga², Motohiro Hirose², Masayuki Kakehata³, Hidehiko Yashiro³, Atsushi Yamazaki¹, and Atsuo Ito²

¹ Faculty of Science and Engineering, Waseda University

² Health Research Institute, Natl. Inst. of Adv. Industrial Sci. and Tech. (AIST)

³ Electronics and Photonics Research Institute, Natl. Inst. of Adv. Industrial Sci. and Tech. (AIST)

Tel: +81-087-869-4218, Fax +81-029-861-6149, E-mail: gentle7939@gmail.com

Polyrotaxane surfaces for regulating osteogenic differentiation

¹Section of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ²Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

○Arun Kumar Rajendran¹, Yoshinori Arisaka², Nobuhiko Yui², Sachiko Iseki¹

[Introduction] The ability to control osteogenic differentiation provides us a prime advantage in the field of tissue engineering for enhancing bone regeneration as well as inhibiting excessive bone formation in pathogenic conditions such as craniosynostosis. Many researches have been carried out by testing various molecules including growth factors, chemicals and siRNAs to achieve this goal. Currently, mechanosignalling has been paid more attention because of the advantages of ease of fabrication and reduction of the cost compared to use of growth factors. Polyrotaxanes (PRXs) are supermolecules exhibiting molecular mobility that could be utilized as mechanical signals for cells. In this study, we show that we could design and synthesize PRXs with different molecular mobilities utilized to alter mechanosignalling in osteoblasts. This control over cellular response was extended to either enhance or inhibit osteogenic differentiation *in vitro*, which could be potentially applied to clinical situations in the future.

[Experiment] PRXs were synthesized by threading α -cyclodextrin (CD) onto polyethylene glycol (PEG) chains. The number of CD molecules per PEG chain was changed to synthesize PRXs with different molecular mobilities. Lock molecules and anchoring polymer segments were added to the ends to prevent dethreading of CDs and attachment of PRXs to various surfaces, respectively. Further, methoxy groups were added to CDs to provide cellular anchoring sites. These PRXs were dissolved in water-ethanol solvent and coated onto either glass cover slips or tissue culture dish surfaces for *in vitro* experiments. A mouse preosteoblastic cell line, KUSA-O, and primary cranial osteoblast cells isolated from postnatal day 0 *Twist*^{+/-} and litter-mate wild type mice (craniosynostosis model mouse) were used. Cell proliferation was measured by cell counting kit- 8 and actin filaments were stained using fluorescent conjugated Phalloidin. Osteogenic differentiation was induced and mineralization was quantified by alizarin red S staining. YAP was detected by immunofluorescence and line profiles were plotted using ImageJ.

[Results and discussion] PRXs with different CD/PEG ratios were synthesized and confirmed using H-NMR. It is known that PRXs with less CD/PEG exhibits high molecular mobility and high CD/PEG shows low mobility. Adhesion of KUSA-O cells was inhibited and delayed on the high mobile PRX surface, but enhanced on low mobile surface. Cellular spreading and actin organization were found to be low on the high mobile surface and vice-versa. The high mobile surface inhibited the mineralization of KUSA-O cells whereas the low mobile PRX surface enhanced indicating that low mobile PRX promoted osteogenic differentiation. YAP, one of the mechanosensing molecules and gene transcription regulators, was retained in cytoplasm when the cells were cultured on the high mobile PRX surface but translocated into the nucleus when cultured over the low mobile PRX surface. Further, mineralization of osteoblasts isolated from *Twist*^{+/-} mice that usually show higher mineralization than those from wild type over normal glass surface, was inhibited by the high mobile PRX surface. These observations indicate that PRXs with different molecular mobilities will be able to control osteogenic differentiation both negatively and positively, which could be applied to clinical use, by altering cellular mechanosensing molecules.

Polyrotaxane surfaces for regulating osteogenic differentiation

Arun Kumar Rajendran¹, Yoshinori Arisaka², Nobuhiko Yui², Sachiko Iseki¹

¹Section of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

²Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-3-5803-5579, Fax: +81-3-5803-0213, E-mail: s.iseki.emb@tmd.ac.jp

機能性分子の直交型固定によるハイドロゲル基材への細胞培養機能付与

¹九州大学 工学研究院 応用化学部門, ²未来化学創造センター バイオテクノロジー部門
 ○濱田 祐成¹, 南畑 孝介¹, Wahyu Ramadhan¹, 後藤 雅宏^{1,2}, 神谷 典穂^{1,2}

【緒言】

再生医療や細胞アッセイへの応用を志向した人工細胞組織の構築には、細胞の生育を物理的に支援する足場材料と細胞の増殖や分化などの機能を制御する機能性分子の利用が不可欠である。機能性分子は不安定かつ高価であるという課題を持ち、その利用は細胞培養の高コスト化の一因となる。そのため、培養環境下において機能性分子を安定的に維持し、その必要量を低減する技術が重要となる。そこで本研究では異なる機能性分子を直交的に提示可能な足場材料を設計することで、細胞培養における新たな機能性足場材料の創製を目指した。足場材料としてハイドロゲルを利用し、その作製法として西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) の酵素触媒反応を活用した手法を採用した。本手法ではチオール (SH) 基を有する高分子、フェノール誘導体、そして HRP を混合するだけでジスルフィド結合を架橋点とするハイドロゲルを簡便に作製できる。また、SH 基修飾分子を構成成分として混合することで、簡便にゲルの修飾が可能である。本研究では、SH 基と二種の直交型固定化機能を有する組換えタンパク質：C-SA-SC を設計した。C-SA-SC は SH 基を有するシステイン残基、biotin リガンドと強固な相互作用する Streptavidin、そして SpyTag と呼ばれるペプチドと選択的に共有結合を形成する SpyCatcher タンパク質からなる。二種の直交型固定化機能を有する C-SA-SC をゲルに導入することで、biotin あるいは SpyTag で修飾された機能性分子を固定し、その必要量の低減及び安定的な維持が可能なハイドロゲル基材の創製を目指した。発表では C-SA-SC 導入ハイドロゲルの機能性分子の固定化機能評価と、機能性分子を固定化したゲル上での細胞機能制御について報告する。

【実験及び結果と考察】

1.C-SA-SC 導入ハイドロゲルの異種機能性分子固定化機能評価

高分子骨格として末端が SH 基で修飾された 4 分岐型ポリエチレングリコール(4-arm PEG-SH)、フェノール誘導体としてグリシルチロシン(Gly-Tyr)、モデル機能性分子として biotin 又は SpyTag を修飾した蛍光分子を用いた。4-arm PEG-SH, Gly-Tyr, HRP, モデル機能性分子をリン酸生理食塩水 (PBS) 中で混合して 37°C で 2 時間静置することでゲルを作製した。ゲルを過剰量の PBS 中で振盪して洗浄した後、蛍光イメージャにより蛍光強度を測定することでゲル中に固定化された機能性分子の濃度を評価した。その結果、C-SA-SC 導入ハイドロゲルは、biotin 修飾分子及び SpyTag 修飾分子の添加濃度に応じて、その固定化量を調節して同時に保持できることが分かった。

2.機能性分子固定化ハイドロゲルを用いた細胞培養

細胞の生存に不可欠な機能である細胞接着性を有する機能性分子として biotin 化細胞接着性ペプチド (biotin-RGDS) を合成した。4-arm PEG-SH, Gly-Tyr, HRP, biotin-RGDS と C-SA-SC を PBS 中で混合してハイドロゲルを作製した。ゲル作製後に洗浄を行った後、NIH-3T3 細胞を播種して 37°C で 4 時間培養し、位相差顕微鏡による観察を行った。その結果、C-SA-SC を固定化させたハイドロゲルに biotin-RGDS を固定化することで、細胞が接着する様子が確認され (Fig. 1)、C-SA-SC 導入ハイドロゲルに固定化された分子による機能性の付与が可能なが示された。現在、SpyTag 融合増殖因子の導入効果を検討しており、その結果についても報告する。



Fig. 1 Adhesion of NIH3T3 cells on biotin-RGDS immobilized PEG-based hydrogel

Providing cell culture functions to hydrogels by orthogonal immobilization of functional molecules

Yusei Hamada¹, Kosuke Minamihata¹, Wahyu Ramadhan¹, Masahiro Goto^{1,2}, Noriho Kamiya^{1,2} *

¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering ²Center for future Chemistry, Kyushu University

*Tel: +81(0)92-802-2807, E-mail: kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

カチオン性/温度応答性ブロック共重合体高分子ブラシを用いた細胞分離技術の検討

慶應義塾大学大学院 薬学研究科
○太田 歩, 長瀬 健一, 金澤 秀子

【緒言】近年、病気や怪我などにより損失した組織や臓器の機能を、細胞を生体内に移植することで人体の再生能力を最大限に引き出して復元させる再生医療が注目を集めている。そのためには移植用細胞を分離、精製する技術が必要である。そこで本研究では、ガラス基板に温度応答性高分子とカチオン性高分子から構成されるブロックコポリマーブラシを修飾した基板を作製し、温度制御による細胞分離を検討した(Fig.1)。カチオン性高分子とのブロック共重合体にすることで、静電的相互作用による細胞接着性の向上を促し、細胞を未修飾、かつ温度変化のみという温和な条件下での細胞分離方法について検討した。

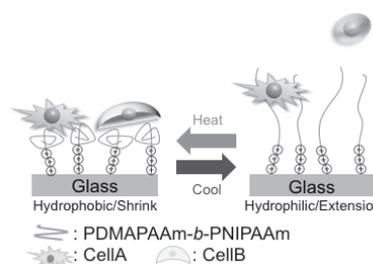


Fig.1 Thermoresponsive-cationic block copolymer brush for cell separation

【実験】ガラス基板表面にカチオン性のジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAAm)を表面開始原子移動ラジカル重合(ATRP)により高密度に修飾した。その後、温度に応答して親水性/疎水性変化を示すポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)を二段階目の ATRP により修飾し、下層にカチオン性、上層に温度応答性を有するブロックコポリマーブラシをガラス基板表面上に作製した。この際、PNIPAAm モノマー濃度を調節して、PNIPAAm ブラシの長さが異なるものを作製した。また、比較対照としてカチオン性を持たない PNIPAAm ホモポリマーブラシを作製した。PNIPAAm の分子量を GPC により測定し、作製した高分子修飾基板表面のゼータ電位を測定した。間葉系幹細胞(MSC)、ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)のゼータ電位を測定した。作製した高分子修飾基板に MSC、NHDF を播種し、37 °Cでの基板への接着挙動、20 °Cでの基板からの脱着挙動を観察した。

【結果と考察】GPC により上層の PNIPAAm の分子量は ATRP の際のモノマー濃度の増加に伴い増加していることがわかった。また、ゼータ電位の測定により、基板表面が正荷電に、細胞表面が負荷電に帯電していることがわかった。基板への細胞の接着挙動を確認したところ、温度 37 °Cでは MSC、NHDF とともに基板に接着している様子が確認された(Fig.2)。温度を 20 °Cに変化させると、接着していた MSC、NHDF は基板から脱着した。これらの結果から、基板表面に修飾されたブロックコポリマーブラシ上層部の PNIPAAm が温度変化により親水性/疎水性変化を促し細胞の接着・脱着を起こしたと考えられる。また、PNIPAAm の分子量が大きい基板では、MSC、NHDF の接着性は減少した。また、カチオン性を有するブロックコポリマーは、PNIPAAm ホモポリマーと比較して接着性が向上した。20°Cでの脱着挙動を観察したところ、NHDF はブロックコポリマーの正電荷の影響で脱着が大きく抑制された。これらの検討から作製した高分子修飾基板は、細胞種によって異なる接着性・脱着性を示し、温度変化による細胞分離への応用の可能性を示した。

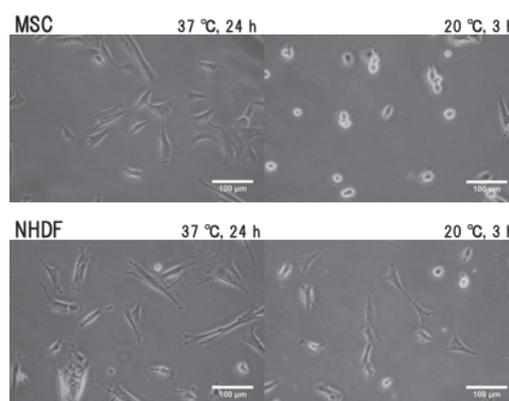


Fig.2 Cell morphologies on thermoresponsive-cationic block copolymer brushes at 37 and 20 °C observed after 24 and 3 h incubations respectively

Temperature-modulated Cell Separation using Thermoresponsive-Cationic Block Copolymer Brushes

Ayumu Ota, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa

Graduate School of Pharmacy, Keio University

Tel: +81-3-5400-1378, Fax: +81-3-5400-1378, E-mail: nagase-kn@pha.keio.ac.jp

ポリ乳酸足場材料上の軟骨細胞培養及び分化の評価

東京工業大学¹ 生命理工学院, ²東京農業大学 生命科学部 分子生命化学科
○チュウ モウチェン¹, 川村 勇樹¹, 廣江 綾香², 田口 精一², 田川 陽一¹

【緒言】関節の軟骨は骨の端を覆い、関節運動を行う際に重要な役割を果たしている。関節軟骨は軟骨細胞と細胞外マトリックスのⅡ型コラーゲン及びアグリカンにより作られ、滑らかな関節運動を支え、衝撃を和らげる役割を果たす。ケガや加齢などの原因による関節軟骨が受ける損傷は自己修復が難しい。関節軟骨内には血管が存在していないため、自己再生能力がない。現在、変形性関節症などの関節軟骨の損傷に対する治療法として、自己骨軟骨細胞移植などが試みられている。しかし、線維軟骨の形成などの問題が残っており、安定な臨床プロトコルが確立されていない。ポリ乳酸は生体吸収性ポリマーとして幅広く研究されており、水分により加水分解される。加水分解後の生成物としての乳酸が生体内にて代謝可能であり、生体適合性、安全性、力学的強度などが優れていることから、バイオマテリアルとして研究・利用されている。そこで、我々は軟骨組織形成に最適なスキャフォールドとして、ポリ乳酸を基礎とした材料の開発をおこなっている。

【実験】ウサギ軟骨細胞を一定の細胞数で24ウェルプレート内の3Dスキャフォールド上に播種した。その後、7日間軟骨細胞増殖用メディウムで培養した後、軟骨細胞分化用メディウムに切り替え、分化させた。アルシアンブルー（アグリカン）とヌクレオファストレッドアルミニウム硫酸溶液（細胞核）を用いて染色し、アルシアンブルー染色の程度で評価を行った。

【結果と考察】生体吸収性のあるポリ乳酸を主材料とする基材をスキャフォールドとし作製した。まず、2Dのポリ乳酸シートで培養したところ、軟骨細胞の軟骨組織形成がアルシアンブルー染色で確認できた。そこで、軟骨の欠損部は立体的な環境であるので、多孔性の3Dスキャフォールドを作製した。その3Dスキャフォールドで、軟骨細胞を分化用メディウムで培養し、1-3週間について、時間の推移につれて、軟骨組織への分化が進んでいることがアルシアンブルー染色によりわかった。今後は、軟骨分化関連遺伝子である *Col2a1*, *Sox9*, *ACAN* などの発現を調べ、mRNAレベルで分化の進行度を評価し、3Dスキャフォールドの内部における軟骨細胞の分化のレベルを調べるために、3Dスキャフォールド中の軟骨組織の切片を作製し、染色を行い、評価する予定である。

Evaluation of chondrocyte culture and differentiation on polylactic acid scaffold material

Muquan Qiu¹, Yuki Kawamura¹, Ayaka Hiroe², Seiichi Taguchi², Yoh-ichi Tagawa¹

¹Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

²Department of Molecular Biology, Department of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture

Tel: +81-45-924-6355, Fax: +81-45-924-5809, E-mail: qiu.m.aa@m.titech.ac.jp

細胞浸潤性を向上する疎水化ゼラチンゲルの創製

¹筑波大学大学院数理物質科学研究科, ²物質・材料研究機構機能性材料研究拠点バイオ機能分野
○水野 陽介¹, 田口 哲志^{1,2}

【緒言】 外傷・疾病等により機能が失われた臓器を回復させるために、細胞・組織を移植することで機能を再生させる手法が提案されている。移植細胞の生存性・生着率を高めるために、材料に求められる特性の一つとして、材料への細胞浸潤性が求められている。

そこで、本研究では、低温流動性の高いタラ由来ゼラチン (Alaska pollock-derived gelatin, ApGltin) をヘキシル基により疎水化したヘキシル化タラゼラチン (C6-ApGltin) を合成した。C6-ApGltin は医療応用実績のあるポリエチレングリコール系架橋剤 (4S-PEG) と組み合わせることで *in situ* ゲル化可能な C6-ApGltin ハイドロゲルを調製し、ハイドロゲル内部への細胞浸潤性に対する疎水基の効果を検討した。

【実験】 C6-ApGltin は ApGltin に含まれるリジン残基 (アミノ基) に対してヘキサナールを反応させ Schiff 塩基とした後に 2-ピコリンボランにより還元することで合成した (Fig. 1A)。ヘキシル基の導入率は 2,4,6-トリニトロベンゼンを用いた方法 (TNBS 法) により定量し、また ¹H 核磁気共鳴分光法 (¹H-NMR) およびフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) によりヘキシル基の定性分析を行った。C6-ApGltin は 4S-PEG 架橋剤と混合することでゲル化させた。得られた C6-ApGltin ハイドロゲルを用いて、動的粘弾性、膨潤度、水接触角評価、ピレンによるゲル内部の疎水性評価を行った。さらに、細胞を用いた *in vitro* およびラットを用いた *in vivo* 細胞浸潤性の評価を行った。

【結果と考察】 C6-ApGltin ハイドロゲルは未修飾ゼラチン (Org-ApGltin) ハイドロゲルと比較して弾性率、膨潤度の有意な差は認められなかった。一方、*in vitro* および *in vivo* 細胞浸潤性評価では、C6-ApGltin ハイドロゲルは Org-ApGltin と比較して細胞浸潤性が有意に増加した (Fig. 1B)。ピレンを用いた C6-ApGltin ハイドロゲルの疎水性評価では、Org-ApGltin ハイドロゲルと比較して蛍光強度が増加したため、疎水的な部分が存在することが明らかとなった。さらに、水接触角測定では Org-ApGltin ハイドロゲルと比較して C6-ApGltin ハイドロゲル内部への水の浸透速度が有意に高かった。以上の結果から、C6-ApGltin ハイドロゲルは導入したヘキシル基同士の疎水性相互作用により架橋構造の不均一化が起きたために、細胞浸潤性が向上したと考えられた。

【結論】 C6-ApGltin ハイドロゲルは、導入されたヘキシル基同士の分子間疎水性相互作用により架橋構造の不均一化を誘導し、細胞浸潤性を向上させた。調製したゲルは *in situ* 硬化型のゲルであるため、インジェクタビリティ、機械的強度、細胞浸潤性を兼ね備えたハイドロゲルの調製が可能であると考えられた。

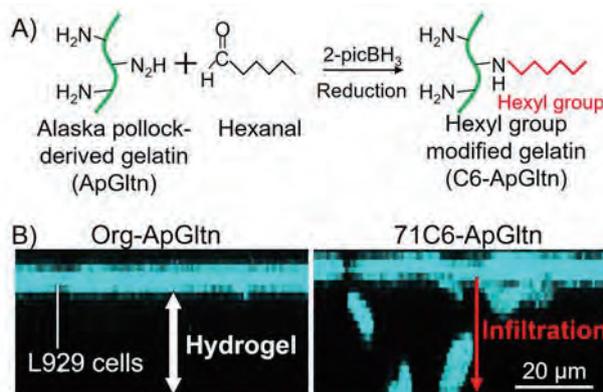


Fig. 1. (A) Synthesis of C6-ApGltin by reacting primary amine group of ApGltin and hexanal followed by hydride reduction. (B) Evaluation of cell migration into C6-ApGltin hydrogel observed by confocal microscope.

Development of cell migration inducible hydrogel composed of hydrophobically-modified fish gelatin Yosuke Mizuno¹ and Tetsushi Taguchi^{1,2}

¹ Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

² Biomaterials Field, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science

Tel: +81-29-860-4498, E-mail: TAGUCHI.Tetsushi@nims.go.jp

骨組織形成を指向したタンパク質ハイドロゲルに関する研究

東京工業大学生命理工学院

○山本 遼太郎, 眞下 泰正, 三重 正和, 小島 英理

【緒言】組織工学において、適切な足場材料の設計は不可欠である。これまでに当研究室では、細胞の3次元組織形成を実現するための足場材料として、温度に応答してハイドロゲル化する融合タンパク質(AVGVP)42-D88-CL (coiled-coil unit bound ELP; O-CUBE)を開発した。この融合タンパク質は、温度に応答して疎水性相互作用により凝集するエラスチン由来の疎水性ポリペプチド(AVGVP)の42回くり返し配列、ELPの過剰な凝集を防ぐポリアスパラギン酸D88、融合タンパク質同士の架橋点となるアンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL (CL) からなり、エラスチン由来の(AVGVP)42のはたらきにより温度応答的にハイドロゲル化する。このハイドロゲルは、生体適合性や生分解性に優れており、タンパク質濃度を調整することによりゲルの硬さを制御することができるため、組織工学の足場材料として使用することができる。さらに、この足場材料設計を基盤として、このタンパク質に細胞接着能を付与するために骨シアロタンパク質(BSP)由来のRGD配列を挿入したAVGVP42-D88-bRGD-CL (bRGD-CUBE ; B-CUBE)を開発した。本研究では、このB-CUBEを3次元組織形成の足場材料としてヒト間葉系幹細胞(hMSC)の骨芽細胞分化誘導による骨組織の形成を目的とした。

【実験】CUBEタンパク質は大腸菌発現系によって発現させ、エラスチン由来ポリペプチド特有の精製方法であるInverse Transition Cycling (ITC)法により精製した。精製したタンパク質をPBSで希釈し、温度応答的にハイドロゲル化するタンパク質溶液を得た。相転移温度の測定を行い、加温によるゲル化及び冷却によるゾル化の確認を行った。また、CUBEタンパク質をコートしたプレート上で、hMSCの細胞接着や増殖能を評価した後、骨分化誘導培地を用いることで2次元でのhMSCの骨芽細胞分化誘導を行い、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。3次元培養において骨芽細胞分化誘導を行う際には、B-CUBEハイドロゲル内にhMSCを包埋させて滴下することによりドロップレットを形成させて、37°Cに加温することでハイドロゲルを作製した。ここに骨芽細胞分化誘導培地を加えることで、細胞の分化を誘導した。

【結果と考察】精製したタンパク質溶液は30°C以上に加温することよりハイドロゲル化することを確認した。このタンパク質ハイドロゲルは、相転移温度測定の結果から温度応答性を有することが示された。また、O-CUBEとB-CUBEをプレートにコートした上でhMSCを培養したところ、RGD配列が存在するB-CUBE上でのみ細胞の接着があった。骨分化誘導培地を用いたB-CUBE上でのhMSCの骨分化誘導の実験では、培養から12日後に骨芽細胞分化マーカーであるALP活性を見るためにALPの基質であるBCIP-NBT溶液を用いて染色を行った。骨分化誘導培地で培養した細胞が染色されたことから、B-CUBE上での骨芽細胞への分化が可能であることが示された。更に、B-CUBEハイドロゲル内でhMSCの3次元培養が可能であることがわかり、骨芽細胞分化誘導の実験では2次元の場合と同様のALP活性測定により骨芽細胞分化を確認することができた。



Figure 1. B-CUBE hydrogel droplet

Research of protein hydrogel for bone tissue formation

Ryotaro Yamamoto, Yasumasa Mashimo, Masayasu Mie, Eiry Kobatake

School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

Tel: 045-924-5761, Fax: 045-924-5779, E-mail: yamamoto.r.ah@m.titech.ac.jp

ヒアルロン酸を用いた網目状ナノファイバーシートの創製と非伸展接着細胞培養への応用

¹東京薬科大学大学院生命科学研究科,²東京薬科大学生命科学部

○川西 隆仁¹, 久保田 萌², 青木 元秀¹, 熊田英峰¹, 梅村 知也¹, 内田 達也¹

【緒言】多くの接着培養系において、細胞はフラスコやシャーレ等の硬い容器で培養される。しかし、未分化性を有する多能性幹細胞はフラスコの硬さ及び基質-インテグリン相互作用により、必要以上に伸展してしまうため未分化性を維持できなくなる。上記の問題を解決すべく、伸展接着を抑えた「ソフトな細胞足場」の開発が喫緊の課題と言える。そこで本研究グループでは細胞外マトリックスの主要成分であるヒアルロン酸に着目した。ヒアルロン酸は保水性や粘弾性としての機能だけでなく、細胞表面の CD44 と相互作用することで細胞増殖や未分化性維持に寄与している。しかしながらヒアルロン酸は吸水性に優れている為、ナノファイバーの構築及び培養液中の形態保持は困難である。発表では、エレクトロスピンニング法によるナノファイバー構築の至適条件及び、*in situ* 架橋法によるヒアルロン酸ナノファイバーシート(HNFS)の耐水化について報告する。また、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を用いて評価した結果も併せて報告する。

【実験】ヒアルロン酸(MW < 1,000k)を化学修飾した後、PEO、milliQ 水、N,N ジメチルホルムアミドを混合し、ヒアルロン酸ポリマー溶液を調整した。作製した溶液をエレクトロスピンニング法にてヒアルロン酸ナノファイバーシート(HA-NF)の作製を試みた。HA-NF 作製時における温度、湿度による影響を走査型電子顕微鏡(SEM)にて評価した。また、作製した HA-NF をカルボジイミド系とエポキシ基を有する架橋剤をそれぞれエタノール溶媒中で *in situ* 架橋した。その後、エタノール、milliQ 水及び液体培地で逐次洗浄した。次いで、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を用いて HA-NF 上で 37°C、5%CO₂ の環境で培養した後、SEM による形態学的評価を行った。

【結果と考察】ヒアルロン酸ナノファイバーシート(HA-NF)構築において、湿度を低く保つことにより、Fig. 1(A)に示す様な間隙を有するナノファイバーシートが得られた。この結果より再現性の高い基材構築の条件が同定された。また、Fig. 1(B)に示す通り *in situ* 架橋法によりナノファイバーの形態が培養液中でも保持されていることが示された。培養液中の HA-NF は繊維の緩みを確認でき、細胞が潜り込める柔軟性が示唆された。さらに、架橋後の HA-NF はヒアルロニダーゼによる分解も確認された。次いで、NHDF を用いた実験により細胞の形態が大きく異なる結果が得られた。カバーガラス上に培養した NHDF は「面」で接着し、細胞核が見える程大きく伸展しているのに対して、ヒアルロン酸ナノファイバーシート(HA-NF)では点や線で接着し、球状形態を維持した状態で繊維の中に潜り込む様子が存在していることが示された。カバーガラス上の NHDF では見られない顆粒物質の存在や細胞がヒアルロン酸ナノファイバーを取り込んでいる様子も確認された。以上の結果より、開発したヒアルロン酸ナノファイバーシートは細胞表面の CD44 とヒアルロン酸の相互作用が機能しながら、細胞伸展を抑えられる基材であると示唆された。細胞伸展を抑えたまま培養できる新規の培養基材として再生医療に貢献できると期待される。

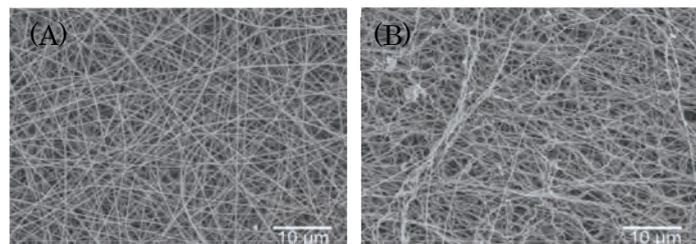


Fig. 1 (A)ヒアルロン酸ナノファイバーシート,
(B)培養液中のヒアルロン酸ナノファイバーシート

Development of nanofiber networks based on hyaluronan which enable 3D-cell culture suppressing cell spreading

Ryuto Kawanishi¹, Megumi Kubota¹, Motohide Aoki¹, Hidetoshi Kumata¹, Tomonari Umemura¹, Tatsuya Uchida¹,

¹Graduate School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,

²Department of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,

Tel: +81-42-676-5093, Fax: +81-42-676-6354, E-mail: uchi@toyaku.ac.jp

鎖長の異なる低分子量ポリリン酸の金属イオンによるゲル形成能と生体適合性評価

¹ 東京大学大学院工学系研究科, ² 東京大学大学院医学系研究科
 ○大川 将志¹, 太田 誠一², 伊藤 大知^{1,2}

【緒言】 近年、ポリリン酸(PolyP)は血小板から凝固過程¹において放出され止血に寄与し、その効果は鎖長に寄与することが報告された。このため止血材²や再生医療の足場材料などのバイオマテリアルとしての利用が期待される。しかしながら、その生理機能は十分に明らかではない。PolyPの金属イオンとの相互作用や炎症反応への寄与が報告されているが、鎖長100以下の低分子PolyPにおいて、分子量依存性を検討した例は報告されていない。そこで、本研究では重合度100以下のPolyPを用いて、ゲル形成能および炎症に対する鎖長の寄与を検討した。

【実験】 鎖長の異なるPolyP (D.P.=14, 40, 100)とCaイオンとの混合によるゲル化特性を評価した。PolyP水溶液(0.0625-2.0 M:モノリン酸換算)と塩化カルシウム(CaCl₂)溶液(0.0625-2.0 M)を1:1で混合し、その後ゲル化を評価した。また、対イオンの影響を調べるため同様の実験を硝酸カルシウム(CaNO₃)溶液を用いて行った。続いて、鎖長の異なるPolyPの生体適合性評価のためにRAW264.7(マウス腹腔マクロファージ), HUVEC(ヒト血管内皮細胞), MeT5A(ヒト中皮細胞), NIH3T3(マウス線維芽細胞)に対して濃度の異なるPolyP(0.0001-1 M)を暴露後12 h後にWST-8 Assayを行い細胞毒性を評価をした。さらに、炎症に対するPolyPの影響を評価するため、ELISAによりPolyP暴露後12 hにRAW264.7, HUVEC, MeT5AのTNF-α産生量を測定した。

【結果と考察】 重合度が14, 40, 100の3種類のPolyPとCaCl₂, CaNO₃を混合しゲルを形成を認めた(Fig.1)。CaCl₂, CaNO₃いずれの場合も鎖長によらず、ゲル化の閾値濃度は変わらなかった。

また、細胞生存率評価の結果では、4種すべての細胞において12 h時点で濃度0.1 M以上ではコントロール群と比較して、50%以下の生存率を示していた一方で、0.01 M以下の濃度では48 h時点でも80%以上の高い生存率を示していた。細胞毒性評価ではPolyPの鎖長の違いの影響は見られなかった(Fig.2)。

一方でELISAによるRAW264.7のTNF-α産生量測定結果では、PolyPの鎖長が長くなるにつれTNF-α産生量が増加した。また、鎖長14のPolyPのTNF-α産生量はコントロール群と比較して有意な差はなかった(Fig.2)。

以上のように低分子PolyPは鎖長により大きな性質の違いを示すことが示唆された。

【謝辞】 PolyPを提供していただいたリジェンティス株式会社に感謝致します。

【参考文献】 1) J.H. Morrissey *et al*, *Blood*, **116**, 4353-4359 (2010)

2) M.Sakoda, S.Ohta, T.Ito *et al*, *Biomacromolecules*(in press)(2018)

Effect of chain length of polyphosphate on its hydrogel formation with metal ions and biocompatibility

Masashi Okawa¹, Seiichi Ohta², Taichi Ito^{1,2}

¹School of Engineering, The University of Tokyo ²School of Medicine, The University of Tokyo

Tel: +81-3-5841-1696, Fax: +81-3-5841-1697, E-mail: o_masa@chemsys.t.u-tokyo.ac.jp

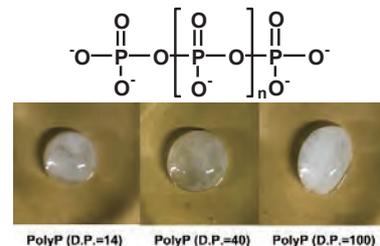


Fig.1 PolyPの化学構造(上)及びPolyPとCaCl₂の混合によるゲル形成(下)

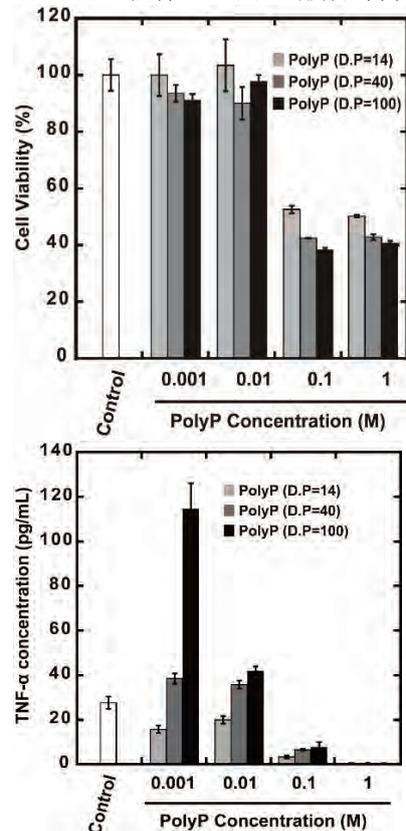


Fig.2 RAW264.7のTNF-α産生量(上)と細胞生存率(下)

Preparation of bifunctional scaffolds for photothermal therapy and tissue regeneration

○Xiuhui Wang^{1,2}, Naoki Kawazoe¹ and Guoping Chen^{1,2}

1. Research Center for Functional Material, National Institute for Materials Science (NIMS)

2. Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

【Introduction】 Breast cancer has become a major threat to female health, whose morbidity and mortality are increasing worldwide. Although surgical resection, chemotherapy, radiotherapy and their combination have been widely applied in clinic, these conventional approaches are reported to sometimes induce adverse effects such as tumor-initiated breast defects, drug resistance and tumor recurrence. To address these issues, it is desired to design and develop a bifunctional scaffold for realizing tumor ablation as a safe and effective method and simultaneously achieving breast reconstruction using bioactive scaffolds. Here, we prepared a bifunctional scaffold for photothermal therapy of breast tumor and adipose tissue regeneration. To do this, highly porous gelatin scaffolds incorporated with gold nanorods (AuNRs) were prepared by a freeze-drying method using ice particulates as a porogen. The AuNR-gelatin porous scaffolds exhibited not only effective photothermal ablation of breast tumor cells under near infrared (NIR) irradiation but also promotive effect on adipose tissue regeneration.

【Materials & Methods】 The AuNR-gelatin porous scaffolds were obtained by freeze-drying the mixture of AuNRs, gelatin solution and ice particulates. Briefly, AuNRs were synthesized by a seed-mediated growth method and were characterized by TEM and visible-near infrared absorption spectroscopy. Ice particulates were prepared by spraying ultrapure water into liquid nitrogen and then mixed with gelatin solution containing different concentration of AuNRs. The constructs were frozen in a silicone mold, freeze-dried and cross-linked to obtain AuNR-gelatin composite porous scaffolds. The composite scaffolds were seeded with breast tumor cells (MDA-MB231-Luc) and cell ablation was conducted by NIR laser irradiation (808 nm) *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, to evaluate the effect of the scaffolds on adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs), hMSCs were cultured in the AuNR-gelatin porous scaffolds with adipogenic medium. After 2-week culture, Oil red O staining and adipogenic gene expression analysis by real time RT-PCR were performed.

【Results & Discussion】 The AuNRs had a rod-like shape with a dimension of 66.1 ± 2.3 nm \times 13.6 ± 2.5 nm (Fig. 1A). Visible-near infrared absorption spectrum showed that the AuNRs had a strong absorption peak in near infrared region (Fig. 1B), which is beneficial for photothermal therapy. SEM observation showed that the AuNR-gelatin composite scaffolds had spherical pores with good interconnectivity and that the AuNRs were homogeneously dispersed in the composite scaffolds without aggregation (Fig. 1C). The AuNR-gelatin scaffolds had a high photothermal ablation efficiency of MDA-MB231-Luc *in vitro* and *in vivo*. In addition, the adipogenic differentiation of hMSCs in AuNR-gelatin scaffolds was confirmed by the formation of lipid vacuoles and the real time RT-PCR results of adipogenesis-related marker genes. In conclusion, the AuNR-gelatin scaffolds showed a high potential for simultaneous photothermal ablation of breast tumor and breast regeneration.

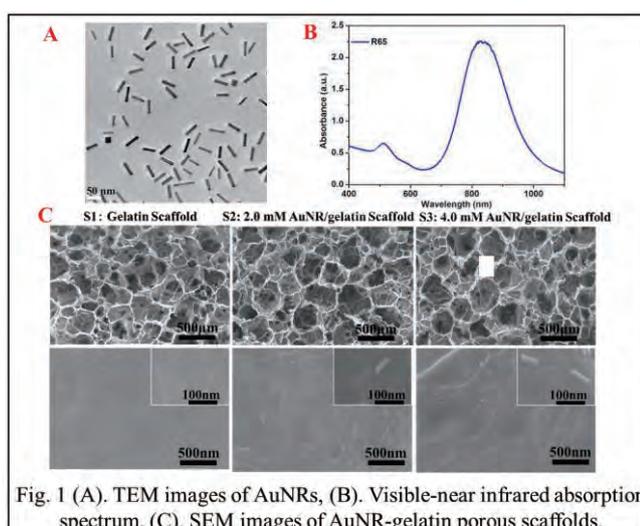


Fig. 1 (A). TEM images of AuNRs, (B). Visible-near infrared absorption spectrum, (C). SEM images of AuNR-gelatin porous scaffolds.

マイクロ流路チップを用いた外側血液網膜関門モデルの開発

¹東北大学大学院工学研究科、²東北大学大学院医学系研究科

○伊藤峻¹、Li-Jiun Chen¹、永井展祐²、西澤松彦¹、阿部俊明²、梶弘和¹

【緒言】

近年、生体の臓器や組織をマイクロ流路チップ内に再現する臓器チップ (Organ-on-a-Chip) の研究がさかんに行われており、病態研究や薬剤スクリーニングに大きな期待が持たれている。これまでに多様な臓器チップが開発されてきたが、網膜組織を対象とした臓器チップの報告例はほとんどない。外側網膜は網膜色素上皮細胞 (RPE) 層とブルッフ膜、毛細血管網である脈絡膜から成り、RPE 層を実体とする外側網膜血液関門 (oBRB) が脈絡膜と網膜間の物質移動を制御し、網膜の恒常性を維持している。網膜疾患においては脈絡膜からの病的新生血管がこの oBRB を障害し、視力低下につながる。そこで、本研究ではマイクロ流路チップ内に RPE、ブルッフ膜、脈絡膜から成る外側網膜の構造を再現し、oBRB における病態を模擬可能な網膜疾患モデルの開発に取り組んだ。

【実験】

使用したマイクロ流路チップは 2 層構造を持ち、上下の流路間を多孔質膜で仕切られている (図 1)。下層流路は複数の流路間にマイクロポストアレイを形成しており、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト肺線維芽細胞 (NHLF) を懸濁させたフィブリンノーゲンとトロンビンの混合溶液を中央と両脇のチャンネルにそれぞれ注入し、ゲル化させた後、培養液で満たした。インキュベータで培養を続け、血管が形成した後、上層流路に RPE を培養することにより外側網膜組織を構築した。上層にて RPE 層、下層にて脈絡膜、多孔質膜でブルッフ膜を模擬している。マイクロ流路チップはフォトリソグラフィによって作製した型にポリジメチルシロキサン (PDMS) を流し固め、作製した。

【結果と考察】

HUVEC は NHLF との共培養において NHLF の成長因子が作用し、3 次元血管構造を形成することが観察された。下層流路において血管形成後、上層流路に RPE の懸濁液を導入したところ、3 次元血管系上方に RPE 単層を培養でき、マイクロ流路チップ内に外側網膜培養モデルを形成できた (図 2)。また、作製したモデルに対して蛍光色素等を通し、透過性試験を行ったところ、RPE 層の存在によって透過率の減少が見られ、血液網膜関門としての機能が示唆された。今後は細胞周辺環境を制御 (高血糖、低酸素状態) することで網膜疾患における病的新生血管を誘導し、外側網膜の病態モデルとして評価を行う予定である。

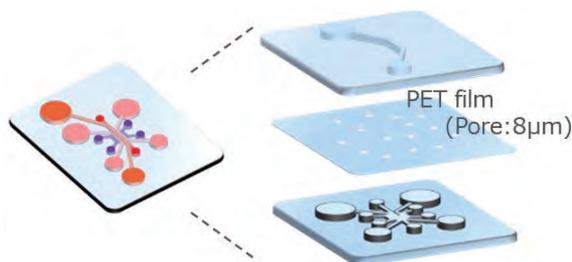


図 1 2 層流路模式図

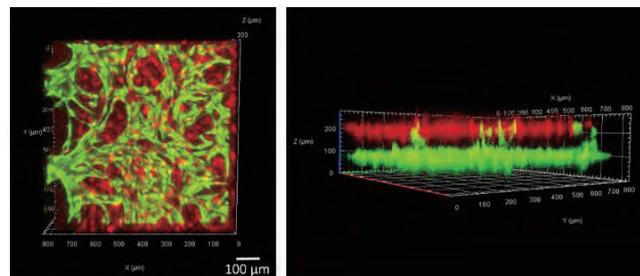


図 2 外側網膜モデル (左: 上面、右: 断面図 赤色が RPE、緑色が HUVEC)

Microfluidic cell culture model of the outer blood retina barrier

Shun Ito¹, Li-Jiun Chen¹, Nobuhiro Nagai², Toshiaki Abe², Matsuhiko Nishizawa¹, Hirokazu Kaji¹

¹Department of Finemechanics, Graduate School of engineering, Tohoku University

²Division of Clinical Cell Therapy, Graduate School of Medicine, Tohoku University

Tel: +81-22-795-3586, Fax: +81-22-795-3586, E-mail: ito@biomems.mech.tohoku.ac.jp

Establishment of Disease Model Using Nano-patterned Scaffold

○ Chia Jung Chang (Presenter)^{1,2}, and Akiyoshi Taniguchi^{1,2}

1. Cellular Functional Nanobiomaterials Group, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan
2. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.

Introduction: Biomaterials topography provided a powerful means to study the influence of extracellular matrix (ECM) topography on cell behavior. Cells are known to be surrounded by nanoscale topography in their natural extracellular environment. Mimicking the natural and abnormal environment of the cells by nanoscale interface is critical to understand how cells modulate their cellular function and activities. The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* effect of surface topographic features that mimic the abnormal renal mesangial matrix on cell behavior. Mesangial cells are specialized cells in the kidney and play an important role in generating and controlling the turnover of the mesangial matrix which provides structural support for integrity of the glomerular capillary loops and mesangial matrix homeostasis.

Method & results: To mimic the physical cues provided by the ECM, amorphous TiO₂ nanogratings with specific dimensional and geometrical characteristics (nanogratings 80 nm wide and 80 nm apart) were fabricated. An immortalized mouse mesangial cell line (MES-13) was cultured on the various nanopattern (cross-link, fibril-like and unpatterned) surfaces and its' morphological and functional changes induced by topographical interface were evaluated, including cellular alignment and the expression of different ECM proteins. The mesangial cells cultured on the fibril-like surface adapted with an elongated morphology. In contrast, cells cultured on the cross-link and unpatterned surfaces showed no elongation and limited spreading. Additionally, immunocytochemistry showed lower levels of laminin-1 and type IV collagen synthesized and higher levels of type I collagen and fibronectin produced in cells cultured on fibril-like surface when compared to those on cross-link and unpatterned surfaces. It is well known that laminin and type IV collagen are the major ECM components in mesangial matrix, whereas novel synthesized type I collagen and fibronectin were detectable in abnormal situation such diabetic nephropathy.

Conclusions: Our data showed the fibril-like nanopattern surface influenced cell morphology changes and ECM protein synthesis. This study evaluates the potential for establishing a model mimicking diseased mesangial matrix to better understand of the interactions between cells and diseased environment.

Establishment of Disease Model Using Nano-patterned Scaffold

○ Chia Jung Chang (Presenter)^{1,2} and Akiyoshi Taniguchi^{1,2}

1. Cellular Functional Nanobiomaterials Group, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan
2. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.
TANIGUCHI.Akiyoshi@nims.go.jp, CHANG.Chiajung@nims.go.jp

異なる組成のエピガロカテキンガレート結合ゼラチンは再生骨の骨質を変化させる

¹大阪歯科大学歯科矯正学講座, ²大阪歯科大学中央歯学研究所, ³東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, ⁴京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル学専攻

○原瑛紀¹, 本田義知², 鈴木治³, 田中知成⁴, 松本尚之¹

【緒言】

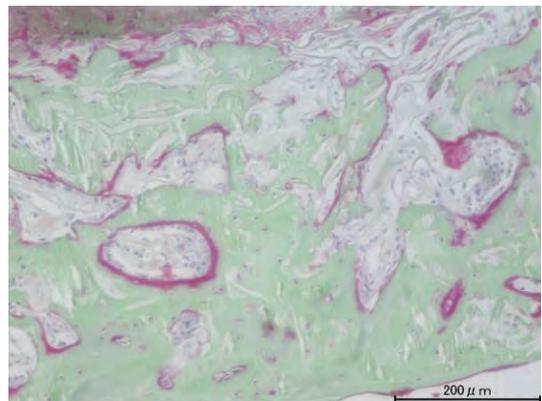
歯科・整形外科領域において優れた骨補填材が求められ、積極的な開発が進められている。緑茶由来の Epigallocatechin gallate (EGCG) は抗炎症等の薬理効果を持つものの、生体内での骨再生に関する効果には更なる解明の余地を残す。近年演者らは、EGCG とゼラチンを化学的に結合させた EGCG 結合ゼラチン (EGCG-GS) を開発するとともに、それに真空加熱処理を施した vhEGCG-GS が優れた骨再生能を示すことを明らかにした。しかしながら、得られた再生骨の骨質についての解明には至っていない。本研究では、EGCG とゼラチンの配合比を変化させた数種類の vhEGCG-GS と、ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて、再生骨の骨質の解明を試みた。

【実験】

ゼラチンには豚皮膚由来の TypeA ゼラチンを、EGCG は緑茶から抽出された EGCG を用いた。両材料の配合比を変化させた EGCG-GS を水中にて合成し、その後凍結乾燥後、150 度 24 時間真空加熱を行い vhEGCG-GS を作製した。合成時、EGCG が 0.0007wt% に対して、ゼラチンを 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0 wt% と変化させ 5 種類の vhEGCG-GS を合成した。vhEGCG-GS の形状及び表面性状は、走査型電子顕微鏡にて確認した。骨形成能評価には、8 週齢の雄性 SD ラットの頭蓋冠に直径 9.0 mm の骨欠損を形成し、各試料を埋入して評価した。埋入 4 週後に、頭蓋冠を摘出し μ CT による骨形態計測と、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色、v.goldner 染色 (下図) による組織学的評価を行った。統計学的評価には、一元配置分散分析と Tukey 法を用いた。

【結果と考察】

0.01wt%ゼラチンで合成した vhEGCG-GS では、スポンジ状の担体が作製できなかった。0.1wt% ゼラチンで合成した vhEGCG-GS では、顕著な骨形成促進が認められなかった。他の vhEGCG-GS では、含まれるゼラチン量の増加に比例し、新生骨形成量が増加する一方、骨密度が低下した。v.goldner 染色画像を確認すると、未成熟コラーゲン (類骨) の比率はゼラチン量が多い vhEGCG-GS ほど高いことが明らかとなった。いずれの試料も欠損内に埋入した EGCG 量が一定であったことを考慮すると、EGCG の薬理効果を発揮するためには、一定量のゼラチンが必須であることが明らかとなった。これは、ゼラチンが骨欠損中の多能性前駆細胞や骨芽細胞に対する足場やスペースメーカーとして使われたためと推察される。また、ゼラチン量の増加が、類骨の比率を高めたのは、足場が増え形成中の骨組織が増加したためと推察された。以上より、vhEGCG-GS に含まれるゼラチン用量の変化は、再生骨の骨質に影響を与える事が示唆された。



Epigallocatechin gallate-modified gelatins with different compositions alter the quality of regenerated bones

Eiki HARA¹, Yoshitomo HONDA², Osamu SUZUKI³, Tomonari TANAKA⁴, Naoyuki MATSUMOTO¹

¹Department of Orthodontics, Osaka Dental University, ²Institute of Dental Research, Osaka Dental University, ³Craniofacial Function Engineering, Tohoku University Graduate School of Dentistry,

⁴Graduate School of Science and Technology Craniofacial Function Engineering

Tel: +81-6-6910-1514, Fax: +81-6-6910-1514, E-mail: hara-e@cc.osaka-dent.ac.jp

細胞骨格タンパク質と相互作用する N-アセチルグルコサミン修飾絹フィブロインの作製

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門, ² 農業・食品産業技術総合研究機構 高度解析センター, ³ 九州大学先導物質化学研究所

○後藤 洋子¹, 山崎 俊正², 伊勢 裕彦³

【緒言】絹フィブロイン (SF) は蚕が生産する繊維タンパク質で人獣共通感染症のリスクがなく、フィルム・スポンジ・不織布などに成形加工できることから、組織再生用の細胞足場材料への応用が検討されている。一方、血管内皮細胞などの間葉系細胞においては細胞骨格タンパク質のピメンチンやデスミンが細胞表面に出現し、細胞が細胞骨格タンパク質を介して N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 糖鎖を認識して結合することが明らかにされている [1]。本研究では簡便な合成化学的手法によって間葉系細胞の接着性が高い SF を作出することを目的とし、これまでに GlcNAc の二糖 N, N' -ジアセチルキトビオース (GlcNAc2) を化学修飾した SF の作製を行い、GlcNAc2 修飾 SF において血管内皮細胞の接着性が向上することを明らかにした [2]。しかしながら、GlcNAc2 は高価であり、またアクリル酸を主鎖として単糖の GlcNAc が結合した合成高分子が細胞骨格タンパク質を発現する細胞と強い相互作用を示すことが見出されたことから [3]、今回入手容易な単糖 GlcNAc を修飾した SF (SF-GlcNAc) の作出を行った。そして、SF への GlcNAc の導入と、導入 GlcNAc のアノマー位の結合様式を確認するため、SF-GlcNAc とレクチンとの認識相互作用の評価を行った。また、SF-GlcNAc と細胞骨格タンパク質との相互作用についても検討を行った。

【実験】SF-GlcNAc の作製は、これまでと同様アルカリ条件下塩化シアヌルとの反応でトリアジニル誘導体とした GlcNAc による可溶性 SF のアミノ酸残基の化学修飾で行った (Fig. 1)。¹H-NMR スペクトルは重水中で Bruker Avance 750 を用いて測定した。レクチンとの認識相互作用の評価として、SF-GlcNAc あるいは SF をコートしたマイクロプレートのウェルへのスクシニル化小麦胚芽レクチン (sWGA) の吸着量の比較を、ビオチン標識 sWGA 及びペルオキシダーゼ標識アビジンを用いたアビジン・ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法により行った。また、SF-GlcNAc あるいは SF のコートウェルに大腸菌より作製したデスミンを添加し、その後抗デスミン抗体を用いた ELISA 法を用いて、デスミンとの相互作用の評価を行った。

【結果と考察】SF-GlcNAc の ¹H-NMR スペクトルでは N-アセチル基のメチル水素に由来する複数のピークが現れて GlcNAc の修飾導入が確認されるとともに、混合比既知の SF と GlcNAc の混合物のスペクトルにおける N-アセチル基のメチル水素とアラニン残基の β-メチル水素のピーク積分値の比較から、SF-GlcNAc 中の糖含有量を 9wt% と推定した。SF-GlcNAc コートマイクロプレートにおける sWGA の吸着量を調べたところ、SF コートマイクロプレートに比べ著しい増加が認められた。この結果は、SF に導入された GlcNAc のアノマー性水酸基は塩化シアヌルとの間に主に β 結合を形成しているため、sWGA によって特異的に認識されたことを示唆する。そして、SF-GlcNAc は SF よりもデスミンと強い相互作用を示したことから、SF-GlcNAc は間葉系細胞の足場材料として有効である可能性がある。

[1] Ise H. et al., *Glycobiology* **20**, 843 (2010).

[2] 後藤ら、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 226 (2017). [3] Ise H. et al., *Genes to Cells* **22**, 900 (2017).

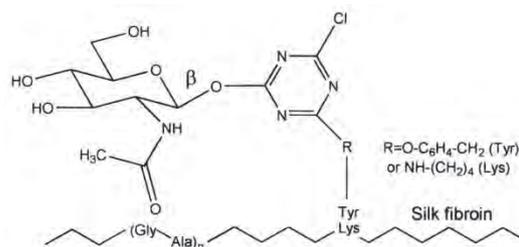


Fig. 1 Chemical structure of SF-GlcNAc.

Preparation of N-acetylglucosamine-modified silk fibroin that interacts with cytoskeletal proteins Yohko Gotoh¹, Toshimasa Yamazaki² and Hirohiko Ise³

¹Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization (NARO),

²Advanced Analysis Center, NARO, ³Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

Tel: +81-29-838-6160, Fax: +81-29-838-6028, E-mail: gotohy@affrc.go.jp

3次元培養のための磁性ナノ粒子含有ハイドロゲルの作製

¹東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻
○徳田真由美¹、森本展行¹、山本雅哉¹

【緒言】

通常、細胞はシャーレ上などの2次元で培養されるが、体内では多くの細胞が、3次元の細胞外環境に存在している。このため、2次元培養では細胞が本来もつ機能の発現が必ずしも期待できないという問題がある。近年、再生医療や創薬研究において、体内の細胞外環境を再現する技術として3次元培養法が注目されている。これまで、細胞シートや細胞包埋ハイドロゲル、細胞凝集体など、多くの3次元培養法が研究されてきたが、手技の複雑さや少ない酸素供給による細胞の死滅、細胞をハイドロゲルから取り出すことが難しい点など、多くの問題点がある。本研究では、3次元培養法として、ハイドロゲルで細胞を挟み込むサンドイッチ培養法に着目した。サンドイッチ培養法は、容易に3次元培養を可能とするが、サンドイッチ状態を維持する技術の開発が必要である。本研究では、磁力によりサンドイッチ状態を維持する方法として、生体適合性をもつ磁性ナノ粒子を含有したハイドロゲルを作製した。

【実験】

牛骨ゼラチン（等電点 5.0、分子量 100,000、新田ゼラチン社製）、塩化鉄(II)および塩化鉄(III)を用いて、共沈法によりゼラチン被覆磁性ナノ粒子を作製した。得られた磁性ナノ粒子は、動的光散乱 (DLS) を用いて評価した。次に、磁性ナノ粒子を I 型コラーゲン溶液 (5 mg/mL) に分散後、ゲル化させることにより、磁性ナノ粒子含有コラーゲンハイドロゲルを作製した。同様に、磁性ナノ粒子を含有したスルホベタインポリマー (PDMAPS) からなる PDMAPS ハイドロゲルを作製した。得られた PDMAPS ハイドロゲルの表面に対して、I 型コラーゲンを固定化することにより、細胞接着性を付与した。得られた磁性ナノ粒子含有ハイドロゲルとネオジム磁石とを用いて、イヌの腎尿細管上皮細胞 (MDCK 細胞) をサンドイッチ培養法により3次元培養した。

【結果と考察】

DLS 測定の結果から、共沈法により平均粒径 300 nm のゼラチン被覆磁性ナノ粒子を得ることができた。この磁性ナノ粒子含有コラーゲンハイドロゲルを用いて、MDCK 細胞に対してサンドイッチ培養を行ったところ、MDCK 細胞が2次元培養とは異なる形状へ変化することがわかった (データ省略)。一方、培養に用いたネオジム磁石の強い磁力によって、コラーゲンハイドロゲルから磁性ナノ粒子が漏出することがわかった (データ省略)。この問題を解決するために、PDMAPS を化学架橋したハイドロゲル内に磁性ナノ粒子を含有させた。その結果、磁性ナノ粒子を PDMAPS ハイドロゲル内に留めることができた。さらに、I 型コラーゲンを表面に固定化することにより、PDMAPS ハイドロゲル表面に対して、細胞接着性を付与することができた (図 1)。一方、PDMAPS ハイドロゲルの大きな浮力のため、磁力によるコントロールが容易でないこともわかった。このため、磁性ナノ粒子などに改善の余地があることが示唆された。



図 1 PDMAPS ハイドロゲルに接着した MDCK 細胞

Preparation of hydrogels containing magnetic nanoparticles for 3D culture

Mayumi Tokuda¹, Nobuyuki Morimoto¹, Masaya Yamamoto¹

¹Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University
Tel: +81-22-795-7313, Fax: +81-22-795-7313, E-mail: mayumi.tokuda.q8@dc.tohoku.ac.jp

細胞コーティング技術を用いた三次元培養口腔歯肉・粘膜モデルの開発

¹大阪大学大学院歯学研究科・顎口腔病因病態制御学講座・口腔外科学第二教室, ²大阪大学大学院生命機能研究科・ビルディングブロックサイエンス共同研究講座

○西山 今日子¹, 岩井 聡一¹, 赤木 隆美², 明石 満²

【緒言】三次元培養皮膚モデルや口腔歯肉・粘膜モデルなどの表皮モデルは、医薬品や化粧品の効果判定・毒性試験、再生医療研究等に応用されている。皮膚と口腔では、同じ重層扁平上皮構造を示すが、皮膚表皮および口腔歯肉上皮では正角化、口腔粘膜上皮では錯角化を示し、角化挙動に大きな違いが見られる。そのため、これらの表皮構造を再現した三次元表皮モデルの開発が求められている。我々はこれまでに、交互浸漬法 (Layer-by-layer: LbL 法) により細胞表面に細胞外マトリックス (ECM) 成分からなる薄膜を形成することで、細胞を自在に三次元的に積層化できる技術を開発した。本細胞コーティング技術は、複数細胞の配置制御により血管・リンパ管網を含む多種多様な生体組織モデルの構築が可能である。そこで本研究では、LbL 法を用いて、ヒト口腔由来線維芽細胞と、2種類のヒト口腔上皮細胞株を用いて、生体類似の口腔歯肉・粘膜モデルの作製を試み、組織学的に評価した。また、多様な生理現象を評価できる三次元培養口腔モデルの開発を目指し、付属器として血管様構造を含む口腔歯肉・粘膜モデルの構築について検討した。

【実験】ヒト口腔線維芽細胞 (HOMF) をフィブロネクチン (FN) およびゼラチン (G) の溶液に交互浸漬することで FN/G 薄膜でコーティングし、カルチャーインサートに播種することで、HOMF から真皮層モデルを構築した。その後、HOMF 層上にヒト口腔歯肉由来上皮細胞 (HOMK) または口腔粘膜由来上皮細胞 (HOK) を播種し、エアリフト (気-液界面) 培養により HOMK および HOK の分化誘導を行った (Fig. 1)。また、血管様構造を含む口腔モデルについては、真皮層構築時に、FN/G をコーティングした HOMF に、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を加え、同様に培養した。口腔モデルの組織学的評価は、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色、免疫組織染色を用いた。

【結果と考察】分化誘導 7 日後の組織切片の HE 染色像から、HOMF の積層体からなる真皮層の上に、上皮細胞の分化誘導に伴う階層構造および E-カドヘリン等の上皮細胞間接着が認められた。また、我々がこれまでに報告してきた培養皮膚モデルと比較し、培養口腔モデルを特徴付ける染色結果も得ることが出来た。さらに、上皮細胞として HOMK を用いたモデルは正角化を (Fig. 2a)、HOK を用いたモデルでは錯角化を示し (Fig. 2b)、上皮細胞の採取部位に一致した上皮分化誘導が可能であった。血管様構造を含む培養口腔モデルについては、共焦点顕微鏡・免疫組織染色にて、網状・管腔構造を観察することができ、真皮層に血管様構造を有していても、同様の上皮構造が構築できることが明らかとなった。血管様構造を含む本モデルは、移植材料・再生医療へのさらなる応用や、動物実験を代替する評価ツールとしての活用・試験法の開発の発展が期待される。

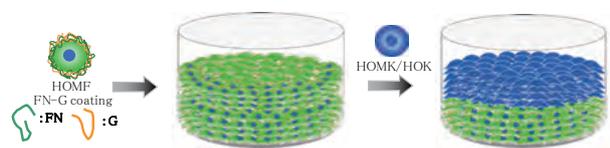


Fig.1. Construction of dermo-epidermal gingiva/mucosa equivalents using the layer-by-layer (LbL) cell coating technique.

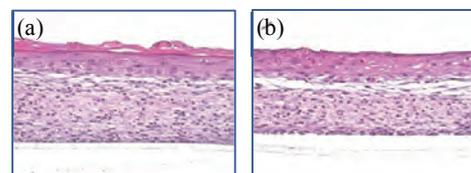


Fig.2. HE-stained images of 3D dermo-epidermal gingiva (a) and mucosa (b) equivalents consisting of HOMF and HOMK (a) or HOK (b).

Construction of three-dimensional (3D) dermo-epidermal gingiva/mucosa equivalents using cell coating technology

Kyoko Nishiyama¹, Soichi Iwai¹, Narikazu Uzawa¹, Takami Akagi², Mitsuru Akashi²

¹Department Oral and Maxillofacial Surgery II, Graduate School of Dentistry, Osaka University, ²Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

Tel: +81-6-6879-2941, Fax: +81-6-6879-2170, E-mail: k-nishiyama@dent.osaka-u.ac.jp

人工多能性幹細胞から誘導される神経前駆細胞を効率よく増幅するための培養基材の設計

¹ 広島大学大学院医歯薬保健学研究科生体材料学, ² 広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯科矯正学

○山内 優佳^{1,2}, 平田 伊佐雄¹, 谷本 幸太郎², 加藤 功一¹

【緒言】

神経前駆細胞 (NPC) は中枢神経を構成するニューロン、グリア細胞、オリゴデンドロサイトに分化することから、パーキンソン病や脊髄損傷などの中枢神経疾患の治療に有効であると期待されている。2018年には、他人のiPS細胞より得たNPCを用いて、パーキンソン病患者に対して細胞移植を行う臨床研究も開始される。また近年、iPS細胞由来のNPCから末梢神経を再生させるための研究もみられ、口腔・顎顔面領域における末梢神経の再生治療にも期待が膨らむ。しかしながら、そのような細胞療法の普及には、iPS細胞由来の神経幹細胞を短期間の間に大量かつ高純度で得る方法が必要である。そこで、本研究ではiPS細胞から分化したNPCを効率的かつ高純度で得るための培養方法の確立を目的とした。とくに本研究では、上皮成長因子 (EGF) がNPCの増殖を促進することに着目し、EGFを表面に固定した培養基材を設計した。

【実験】

EGFのC末端にHistidineを6つ融合させたEGF-Hisを大腸菌発現系によって合成した。金を蒸着したガラスプレート表面に、11-Mercapto-1-undecanol及び11-Mercapto-1-undecanoic acidを様々な組成で含む溶液を用いて、末端がOHまたはCOOHの自己組織化単分子膜(SAM)を形成させた。これらのSAM表面上にN-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid及びNiSO₄を介してEGF-Hisを固定化し、培養基板を得た。一方、マウスiPS細胞を単個細胞に分散させた後、Pluronic F127でコートし表面を親水化したディッシュに播種し、2% B27、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、および10 nM retinoic acidを添加したDMEM/F-12培地を用いてニューロスフェア培養を行った。6日間培養し直径100~200 μmの細胞凝集体を形成させた。形成された細胞塊を分散させ、再度同じ条件で凝集させた。細胞の凝集と分散を4回繰り返すことで得られた細胞内に発現するNPCマーカー等の発現をqPCR法により分析した。得られたNPCをEGF-His固定化基板上にて培養し、増殖能を調べた。

【結果と考察】

ニューロスフェア培養を繰り返し、qPCRを行った結果、継代を繰り返すごとに、未分化マーカーであるNanog及びOct3/4の発現は減少した。一方NPCのマーカーであるNestinの発現は徐々に上昇し第三世代凝集体において最も高い値を示した。EGFRの発現も同様であった。得られたNPCをEGF-His固定化基板上に播種したところ、NPCに特徴的な二次元の網目状構造を形成して増殖した(図1)。EGF-His固定化基板上では、COOHの比率にかかわらず細胞増殖が認められ、培養7日目に細胞数が約3倍に増加した。一方未分化iPS細胞はEGF-His固定化基板上に細胞接しなかった。以上の結果から、EGF-His固定化基板は、iPS細胞から誘導したNPCの増殖に有効であると考えられる。

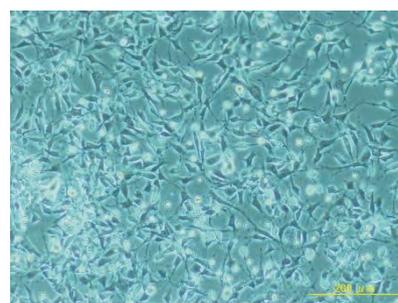


図1. EGF-His固定化基板上で4日間培養したNPCの位相差顕微鏡像。(スケールバー: 200 μm)

Culture Substrates for the Efficient Expansion of Neural Progenitor Cells Derived from iPS Cells

Yuka Yamauchi^{1,2}, Isao Hirata¹, Kotaro Tanimoto², Koichi Kato¹

¹Department of Biomaterials, Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

²Department of Orthodontics and Craniofacial Developmental Biology, Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

Tel: +81-82-257-5648, Fax: +81-82-257-5649, E-mail: yuuka-y33@hiroshima-u.ac.jp

簡便かつ効率的に単一細胞種を分画するためのシステム開発

¹富山大学大学院理工学教育部（工学），²富山大学大学院生命融合科学教育部（先端ナノバイオ），³物質・材料研究機構，⁴日産化学（株）
 ○関 愛梨¹，中路 正^{1,2}，吉川 千晶³，臼井 友輝⁴，岸岡 高広⁴，西野 泰斗⁴

【緒言】迅速に単一細胞種を得る技術の確立は、細胞機能評価、分化誘導評価、細胞移植源の確保など様々な領域で必要とされている。現在、いくつかの細胞分離法が存在するが、中でも蛍光活性化細胞選別や磁気活性化細胞選別などのフローサイトメトリー法が最も広く用いられている。しかしながら、この手法では、細胞を選別するために用いられるラベル化剤が残存してしまうため、細胞自体への影響（特に細胞の特性変化など）が懸念され、医療に用いる細胞を分離する手法としては不適であると考えられる。また、密度勾配遠心法による分離も挙げられるが、この手法では、生体に対して毒性があるパーコールやフィコールなどの試薬を使用しなければならないという大きな問題を抱える。近年では、細胞の大きさの違いを利用して分離する細胞分離膜透過法も開発され利用され始めているが、ほぼ同径の異種細胞は完全に単離できないという欠点がある。このように、近い将来実用化されるであろう細胞医療において、細胞の単離・精製するための最適な方法が、現状では存在しないと言わざるを得ない。そこで本研究では、これまでの細胞分離技術の様々な課題を克服した分離システムの構築を目指す。

【実験】 Carboxymethyl betaine (CMB), 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (MPTMS), propargyl methacrylate (PGMA) からなる三元共重合体をフリーラジカル重合により得た。合成した P(CMB-co-PGMA-co-MPTMS) は、シランカップリング基を介して基材上へ修飾させた。その後、azido-homoalanine (AHA) を C 末端に有する CD44 結合性ペプチド (QQGWFP-AHA, CD44BP) を、PGMA のアルキンと AHA のアジド基間のクリック反応により基材表面に修飾した。

三元共重合体で改質された基材表面と CD44BP を担持させたポリマーで改質された表面の特性について、接触角測定、膜厚測定、全反射赤外分光測定、および microBCA 法によるペプチド担持量測定およびタンパク質非特異吸着測定により評価した。さらに担持させたオリゴペプチドによる特定細胞の捕捉を評価するためにマウス線維芽細胞 (NIH3T3 細胞)、ヒト胎児腎由来細胞 (HEK293)、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の接着を観察した。

【結果と考察】接触角測定、膜厚測定、全反射赤外分光測定および microBCA 測定より、CD44BP が三元共重合体を介して表面に担持されていることが示された。また、CD44BP 担持／非担持いずれのポリマー修飾表面においても、タンパク質の非特異的吸着が抑制されていることが分かった。これは生体物質非応答性を示す双性イオン型モノマーである CMB を含む三元共重合体により被覆したことに起因するものと考えられる。CD44BP 担持ポリマー修飾表面への細胞捕捉を調査した結果、NIH3T3 と HEK293 細胞は表面に捕捉されなかったのに対し、hMSC では捕捉が認められた。また、複数種混合した細胞懸濁液を接触させた場合においても、hMSC のみ捕捉されることが分かった。これらの結果は、ポリマーに担持させた CD44BP を介して CD44 抗原を有する hMSC を選択的に捕捉できることを示すものである。

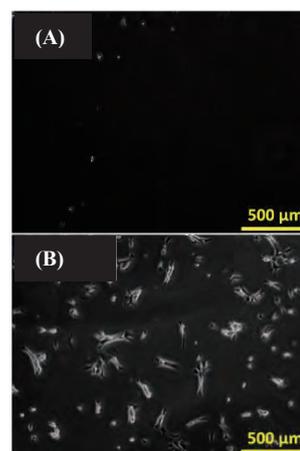


Figure 1. Phase contrast images of hMSC cultured for a day on the surface modified with (A) P(CMB₇₀-co-PGMA₂₀-co-MPTMS₁₀) and (B) CD44BP-modified P(CMB₇₀-co-PGMA₂₀-co-MPTMS₁₀).

Development of simple and convenient system for single cell separation

Airi Seki¹, Tadashi Nakaji-Hirabayashi^{1,2*}, Chiaki Yoshikawa³, Yuki Usui⁴, Takahiro Kisioka⁴, Yasuto Nishino⁴

¹Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, ²Graduate School of Innovate Life Science, University of Toyama, ³International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute of Material Science, ⁴Nissan Chemical Corporation.

Tel: +81-76-445-6552, E-mail: m1871410@ems.u-toyama.ac.jp

分子認識部位を導入した温度応答性ポリマーの設計と変性タンパク質認識挙動

¹ 関西大学化学生命工学部, ² 関西大学 ORDIST
 ○尾崎亮太¹, 河村暁文^{1,2}, 宮田隆志^{1,2}

【緒言】 一本鎖の新生ポリペプチド鎖が生体内でフォールディングされることにより, タンパク質は様々な機能を発現し, 生命の活動を維持する。しかし, コンフォメーションが変化すると, タンパク質の機能が消失する。また, 変性タンパク質が凝集すると, アルツハイマー病およびプリオン病などのフォールディング病が引き起こされる。これらのフォールディング病の診断には, タンパク質のコンフォメーション変化を認識して迅速に応答する材料の開発が必要である。一方, 疎水性の空孔をもつシクロデキストリン (CD) は疎水性化合物を包接することが可能である。たとえば, CD は芳香族アミノ酸と包接錯体を形成することが報告されている。本研究では, タンパク質のコンフォメーション変化を識別する分子システムの創製を目的として, ポリマー状態で下限臨界溶液温度 (LCST) を示すポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) とタンパク質認識部位である CD とからなる CD 導入 PNIPAAm 誘導体 (P(NIPAAm-co-CD)) を合成した。また, モデルタンパク質であるリボヌクレアーゼ A (RNase A) 存在下における P(NIPAAm-co-CD) の LCST 変化について検討した (Fig. 1)。

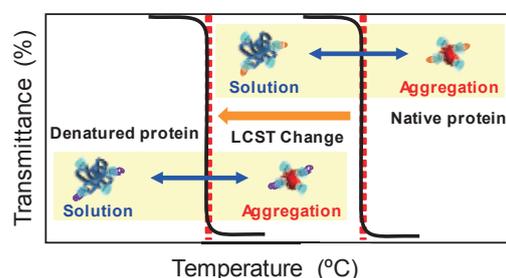


Fig. 1. Schematic illustration for LCST change of a temperature-responsive polymer with protein recognition sites in response to a conformational change of protein.

【実験】 NIPAAm, アクリロイル基を導入した CD (acryloyl-CD) および 2,2'-アズビスイソブチロニトリルをジメチルスルホキシドに溶解させ, 窒素雰囲気下において 70 °C で 6 時間重合することにより, P(NIPAAm-co-CD) を合成した。得られた P(NIPAAm-co-CD) をリン酸緩衝液 (50 mM, pH 7.4) に溶解させ, ネイティブ RNase A および変性 RNase A を添加した際の LCST 変化を濁度測定により評価した。

【結果と考察】 Fig. 2 には, P(NIPAAm-co-CD) を溶解させた緩衝液に変性 RNase A を添加した際の LCST とタンパク質濃度との関係を示した。図より, CD 導入率 7.2 mol% および 10.8 mol% の P(NIPAAm-co-CD) は, それぞれ 34 °C と 36 °C 付近に LCST を示した。これは, 親水性の CD 導入率が高いほど, P(NIPAAm-co-CD) の親水性も高くなるためと考えられる。また, 変性 RNase A 濃度が増加すると, いずれの P(NIPAAm-co-CD) の LCST も低下した。変性 RNase A 濃度が高いほど, P(NIPAAm-co-CD) と変性 RNase A との複合体が増加するために, より顕著に LCST が低下したと考えられる。さらに, CD 導入率が高い P(NIPAAm-co-CD) の方が, 変性 RNase A 濃度の増加に伴って LCST がより顕著に低下した。これは, CD 含有率の高い P(NIPAAm-co-CD) の方が, より多くの変性 RNase A と CD が複合体を形成してポリマー鎖の親水性が低下するためと考えられる。したがって, P(NIPAAm-co-CD) は変性タンパク質を検出する新規な診断材料としての応用が期待できる。

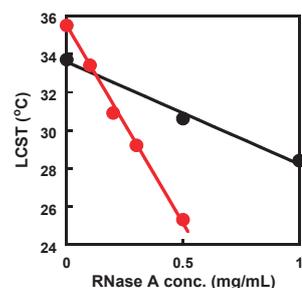


Fig. 2. Effect of temperature on transmittance (650 nm) of P(NIPAAm-co-CD) (CD content: 7.2 (●), 10.8 (●) mol%) in a phosphate buffer solution (pH 7.4, 50 mM) with denatured RNase A. Concentration of P(NIPAAm-co-CD) was 2.0 mg/mL.

Design of Temperature-responsive Polymers with Molecular Recognition Sites and Their Recognize of Denatured Protein

Ryota OZAKI¹, Akifumi KAWAMURA^{1,2}, Takashi MIYATA^{1,2}

¹ Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering ² ORDIST, Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, JapanTel: +81-6-6368-0949, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: tmiyata@kansai-u.ac.jp

中間水を有する枝分かれポリグリセロールの中性子散乱法による水和状態解析

¹神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻,

²九州大学大先導物質化学研究所

○山崎 萌¹, 杉本 洋輔¹, 大谷 亨¹, 田中 賢²

【緒言】 枝分かれ構造を有する生体適合性ポリマーであるポリグリセロール dendrimer (PGD) やハイパーブランチポリグリセロール (HPG) は、化学修飾可能な多数の末端基を有し、直鎖状ポリマーと異なるユニークな性質を有していることからバイオマテリアルの分野で応用が期待されている。PGD が完璧な分岐構造を有している一方で、HPG は分岐構造と直鎖構造の両方を有し、ランダムに分岐している。また、PGD や HPG は繰り返し単位に疎水性のメチレン、メチン骨格を有しているため、水中において分子内に極性の低いマイクロ構造を形成することが報告されている。PGD, HPG は同じ構造式、同じ分子量であっても、分岐度の違いにより末端水酸基の位置が異なるため、ポリマー自体の物理化学的性質や、生体分子との相互作用が変化する可能性がある。このような分岐度効果の検証は新たなバイオマテリアルをデザインする上で多様な選択肢を生み出す足がかりになると考えられる。しかし、個々のポリマーに関する研究は多数行われているものの、それぞれのポリマーを比較した際の特性の違いは明らかではない。そこで本研究では、PGD 及び HPG の分岐性が生体適合性の指標である水の構造（自由水、中間水、不凍水）を示差走査熱量測定 (DSC)、を用いて定量化した。さらに分子レベルでのそれぞれの分子が有する水和構造を中性子小角散乱 (SANS) 測定により解析した。

【実験】

PGD, HPG の合成: PGD をアリル化反応、オスミウム酸化反応により合成した。HPG をアニオン開環重合により合成した。合成の確認を ¹H-NMR, ¹³C-NMR, および MALDI-TOF-MS から行った。

PGD, HPG の水の定量化: HPG (分子量 1, 659), PGD (分子量 1, 689) の様々な濃度の水溶液を調製し、DSC によって得られた水の融解エンタルピーから中間水量、自由水量、不凍水量を算出した。

PGD, HPG の分子構造解析: D₂O/H₂O 混合溶媒にそれぞれ PGD もしくは HPG を 0.5 wt% で溶解し、SANS 測定によって分子レベルでの構造解析を行った。

【結果と考察】 DSC から得られたチャートから、ガラス転移温度と融点の間の温度で生じる低温再結晶は枝分かれ度に関わらず全ての試料において観測された。これらの結果は中間水も含まれることを示しており、多くの報告例がある PGD や HPG の非タンパク質吸着特性を支持するものであった。さらに、水の融解エンタルピーから、ポリマーと強く相互作用し、-100°C 以下でも凍らなるとされる「不凍水」量を各ポリマーについて算出したところ、分岐度の増大に伴って不凍水量は増大した。分岐度の高い PGD や HPG は水中で 3 次元の球状構造をとっており、球周辺の水分子はポリマーが有する水酸基と多点で相互作用したために、直鎖のポリエチレングリコール (PEG) よりも不凍水が増えたことが考えられる。一方で PGD や HPG のグリセロール骨格に囲まれた水分子は運動性が制限され、他の水分子との水素結合が弱まるために凍結しにくくなったことが示唆された。SANS 測定の結果、HPG は球状構造、PGD はコアシェル球状構造に近い構造をとることが示唆された。さらに、溶媒とサンプルの散乱長密度のコントラストから HPG では分子内部での水和が確認されたが、PGD では分子表層に水和殻のような構造が見られた。このことから、分岐度が増加するに従って分子表面の水酸基が増加し、水分子が強くポリマーと水素結合したと考えられる。これらの結果は、分子の分岐構造が大量の不凍水の保持に適していることを示唆した。この枝分かれ分子特有の水和構造は新しいバイオマテリアルへの発展が期待される。

Hydration State of Dendritic Polyglycerols Bearing Intermediate Water

Moe Yamazaki¹, Yousuke Sugimoto¹, Tooru Ooya¹, Masaru Tanaka²

¹Graduate School of Engineering, Kobe University,

²Institute for Materials Chemistry and Engineering Kyushu University

Tel: +81-78-803-6255, Fax: +81-78-803-6255, E-mail: ooya@tiger.kobe-u.ac.jp

金を配列制御した $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{SiO}_2$ ナノ複合粒子の表面増強ラマン散乱による生体分子検出

¹東京工業大学 物質理工学院 材料系

○ 鈴木 敦也¹, 生駒 俊之¹

【緒言】

表面増強ラマン散乱 (SERS) は、レーザー照射下で、金や銀のナノ粒子が近接しているとホットスポットが形成され、そこに吸着した生体分子のラマン散乱が増強される現象である。すなわち、吸着した生体分子を短時間にラベルフリーで検出することが可能であり、疾患診断への応用が期待されている。しかし、ラマン散乱の増強度は、生体分子の吸着サイトに強く依存するため、金属表面の精密な構造制御、かつ検出分子の吸着サイトの増加が必要である。本研究では、四酸化三鉄 (Fe_3O_4) ナノ粒子表面に金を被覆し、さらにチオールの自己組織化膜を形成させ、金ナノ粒子 (AuNP) の配列を制御したナノ複合粒子を作製した。また、最外層の AuNP 間に親水性の二酸化ケイ素 (SiO_2 ; 以下シリカ) を被覆し、生体分子のホットスポットへの吸着を制御した。AuNP の配列制御により高感度な SERS 活性をもち、外部磁場により集積/生体分子を分離可能なナノ複合粒子を創出した。ナノ複合粒子の SERS 感度は、葉酸 (FA) などの濃度変化による増強度の変化率で評価した。

【実験】

クエン酸ナトリウムを用いて湿式法で合成した Fe_3O_4 ナノ粒子に、表面に吸着したクエン酸の還元作用で金を被覆した粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) を作製した。この粒子表面にドデカンチオール/デカンビスチオールを一定量の割合で修飾し、チオール基を露出させた。このチオール基に、平均粒子径約 30nm の AuNP を結合させ、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 表面に固定化した ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{AuNP}$)。粒子表面へのシリカの複合化は、 NH_3 水溶液中に $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{AuNP}$ とテトラエトキシシラン (TEOS) を添加したゾル-ゲル法で行った ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{SiO}_2$)。作製した各粒子のそれぞれを 10^{-5} ~ 10^{-8} M の FA 溶液に所定量を加え、10 分静置した後、外部磁場で集積させてラマン散乱を測定した。

【結果と考察】

AuNP を配列した試料の紫外可視分光スペクトルでは、最外層に形成させた AuNP が近接することによる局所表面プラズモン共鳴ピークの分離が 539 nm と 678 nm に観測され、AuNP の修飾・配列が確認された。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{SiO}_2$ の形態観察では、直径 250 nm の球形粒子が観察され、反射電子像からは $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{AuNP}$ のシリカとの複合化が観察できた。 10^{-6} M の FA を吸着させた溶液へのラマン散乱の測定結果では、AuNP を配列した試料のみ FA のピークが 1452cm^{-1} と 1089cm^{-1} に観測された (Fig. 1)。さらに、 898cm^{-1} のチオールのピークを基準として FA の 1452cm^{-1} との強度比から SERS の濃度依存性を評価した。どちらの試料も 10^{-8} M の FA を検出でき、ナノ粒子表面をシリカで被覆することで、増強度の変化率が大きくなり、濃度変化に鋭敏に反応したことから SERS 感度が向上したことが分かった。これは複合粒子表面をシリカで被覆することで、シリカに優先的に FA が吸着し、検出分子の吸着サイトを増大させた結果と考えられる。

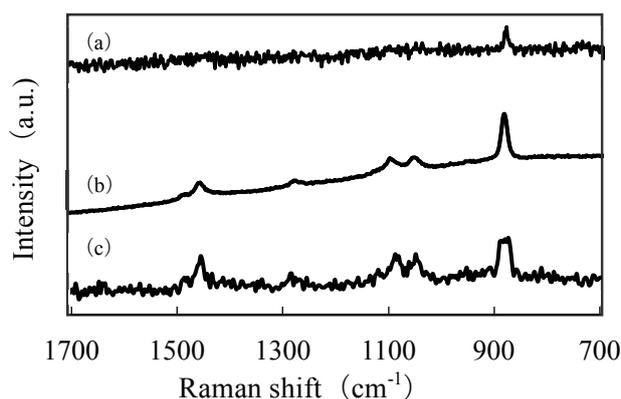


Fig. 1 FA を吸着させたナノ複合粒子のラマンスペクトル:
(a) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$, (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{AuNP}$, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{SiO}_2$

Biomolecule detection by surface enhanced Raman scattering of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}@\text{SiO}_2$ nanocomposite particles with controlled gold arrangement

Nobuya Suzuki¹, Toshiyuki Ikoma¹

¹Department of Materials sciences and Engineering, Tokyo Institute of Technology,

Tel: +81-3-5734-3960, Fax: +81-03-5734-3369, e-mail: tikoma@ceram.titech.ac.jp

Cyodiagnosis of Hypersialylated Metastatic Cancers by Phenylboronic acid-installed PEGylated Gold Nanoparticle Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

¹Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan, ²Material Synthetic Research Department, Nissan Chemical Industries Ltd., Funabashi, Chiba, Japan, ³Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

○Babita Shashni¹, Yukichi Horiguchi¹, Kosuke Kurosu¹, Hitoshi Furusho¹, Yukio Nagasaki^{1,3}

[INTRODUCTION] Cyodiagnosis of metastatic cancers at early stages could greatly limit the number of metastasized cancer-associated mortality. Recent advances in metastatic cancer research have clearly demonstrated that high cell surface density of sialic acid (5-amido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactono-ulosonic acid (neuraminic acid, Neu5Ac)) in malignant transformed cells correlates with their metastasis incidence. Hence, detection of hypersialylated tumors may be an effective strategy to identify metastatic cancers. Moreover, critical dependence of metastatic cancers on reactive oxygen species to maintain hypersialylation signaling pathway accentuates the requirement of redox therapeutics to manage metastatic cancers. Hence, herein report on the diagnosis of hypersialylated cancers by phenylboronic acid-installed PEGylated gold nanoparticles coupled with a Raman reporter, Toluidine blue O (T/BA-GNPs) using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and their management by our original ROS scavenging polymeric micelle, nitroxide-radical containing nanoparticles (RNPs).

[METHODOLOGY] Gold nanoparticles (GNP) were surface functionalized by 3-aminophenylboronic acid (APBA)-poly(ethylene glycol)-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)] (PEG-*b*-PAMA) polymer (APBA-PEG-*b*-PAMA). APBA selectively targets neuraminic acid (Neu5Ac), whereas PEG and PAMA segment acts as dispersion agent and attaches to GNP, respectively (Figure 1). To demonstrate the performance of this SERS-based detection system, Toluidine blue O (Raman reporter) and APBA-PEG-*b*-PAMA co-immobilized on GNPs (T/BA-GNPs) were tested by *in vitro* and *ex vivo* experiments. Abrogation of ROS sensitive sialic acid pathway by RNPs was confirmed by expression studies.

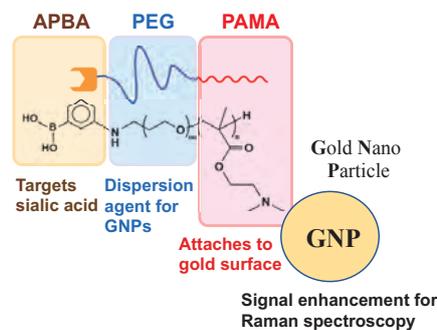


Figure 1. Sialic acid targeting APBA-PEG-*b*-PAMA-GNP

[RESULT and DISCUSSION] The results obtained from these studies are listed as follows:

1. The average diameter of T/BA-GNPs prepared was ca. 53 nm with a zeta potential (mV) of -0.5 at pH 7.4.
2. Strong SERS signals from metastatic cancer cell lines (breast cancer; MDA-MB-231 and colon cancer; Colon-26) were observed, contrary to non-metastatic MCF-7 cells (breast cancer). The detected SERS signals from various cancer cell lines correlated with their reported metastatic potential, implying that our T/BA-GNP based SERS system was capable of distinguishing the metastaticity of cells based on the surface Neu5Ac density.
3. T/BA-GNP based SERS system also significantly differentiated between hypersialylated tumor (MDA-MB-231 tumor xenograft model), low sialylated tumor (RNP treated MDA-MB-231 cancer cells) and healthy tissues.
4. Upon RNP treatment, a reduction in sialic acid-associated SERS signals from MDA-MB-231 surface was observed, which was attributed to ROS-mediated disruption of sialylation by impairing the activation of NF- κ B-sialyltransferase signaling cascade.

Cyodiagnosis of Hypersialylated Metastatic Cancers by Phenylboronic acid-installed PEGylated Gold Nanoparticle based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Babita Shashni¹, Yukichi Horiguchi¹, Kosuke Kurosu¹, Hitoshi Furusho¹, Yukio Nagasaki^{1,3}

¹Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan,

²Material Synthetic Research Department, Nissan Chemical Industries Ltd., Funabashi, Chiba, Japan,

³Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

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

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

細胞外ベシクルの簡便・高感度検出のための マイクロチップおよび検出プロトコルの検討

東理大院基礎工¹・順天堂大医²・理研前田バイオ³

○片桐明日香¹, 石原量², 中島忠章^{1*}, 細川和生³, 前田瑞夫³, 友岡康弘¹, 菊池明彦¹

【緒言】 がんのバイオマーカーとして、体液中に存在する細胞外ベシクル(EV)が、その内部や膜にがん特異的な核酸やタンパク質を含むことから注目されている^[1, 2]。既存の EV 検出手法は、煩雑で時間がかかり、多くの試料体積が必要となる^[3]。そのため、EV を、その場検査(POCT)に利用するという観点からは課題が残る。当研究室では、POCT を実現する材料として、低コスト・短時間・少ない試料体積・ポンプ無しで使用できる poly(dimethylsiloxane) (PDMS)製マイクロチップ^[4]に、UV グラフト重合法を適用し、機能性を付与した自律駆動マイクロチップ(SF-PF microchip)を作製し、EV の簡便な検出に成功している^[5]。また、流路の一部を狭窄させ抗体と機能化表面の接触効率を向上させ、高感度化にも成功した。しかし、体液中に存在するがん細胞由来の EV を検出するためには、さらなる高感度化が課題であった。そこで本研究では、自律駆動のために必要な乾燥工程が一部の抗体を失活させている可能性を考え凍結乾燥を導入し、さらに、より高効率かつ多量の EV を捕捉するために検出プロトコルを改良することで検出の高感度化をめざした。

【実験】 光増感剤である benzophenone (10 wt% in acetone)を PDMS マイクロチップ流路表面に固定し、2-aminoethyl methacrylate (AEMA) (0.25~3.0 mol/L in water)で流路を満たし、10 分間 UV 照射 (365 nm, 100 W)し、PAEMA をグラフト重合した。さらに、anti-CD63 抗体 (1.0 mg/mL)で流路を満たし、37 °C で 2 時間、湿度 100 % で静置して抗体を固定し、その後脱気した。抗体固定後に 2 μL の超純水で流路を満たし、凍結乾燥した。作製した SF-PF microchip を用いて、乳がん細胞(MCF-7)由来の EV を、層流樹状増幅法(LFDA)^[6]によって検出した。

【結果と考察】 ブロッキング、EV 捕捉、蛍光シグナル増幅の 3 ステップからなる LFDA の、EV 捕捉ステップを 5 分から 10 分間まで延長することで、signal/blank 比は、3.5 倍となり、5%水準で有意に増加した(two-tailed *t*-test, *n*=3)。これは、EV と機能化表面との接触確率が改善したためである。また、SF-PF microchip を凍結乾燥したのちに EV 検出した結果、signal/blank 比は 15 から 20 となり、5%水準で有意に増加した(two-tailed *t*-test, *n*=3) (**Fig. 1**)。これは、凍結乾燥しない場合と比較して、より多くの抗体の構造が保たれ、抗体活性を維持できたためと考えられる。本研究において必要とされるサンプル量は 2.0~3.0 μL であり、検出に必要な時間は 25 分以内であった。以上のことから、本研究で提案している SF-PF microchip は、がんの POCT 実現への貢献が期待できる。

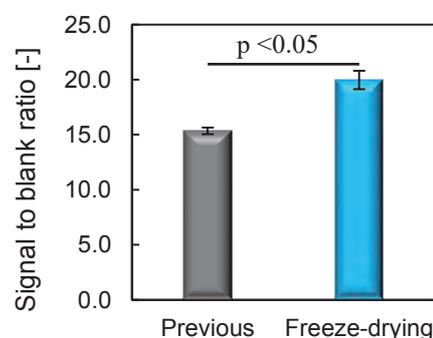


Fig. 1 Improvement of EV detection (mean ± SD, *n*=3).

【参考文献】 [1] H. Varadi *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **2007**, 9, 654-659. [2] S. Melo, *et al.*, *Nature*, **2015**, 523, 177-182. [3] B. Tauro *et al.*, *Method*, **2012**, 56, 293-304. [4] K. Hosokawa *et al.*, *Lab Chip*, **2004**, 4, 181-185. [5] R. Ishihara *et al.*, *Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress*, **2016**. [6] K. Hosokawa *et al.*, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 6000-6004.

*現東大生産研

Investigation of the Microfluidic Chip and Detection Protocol For Rapid and Sensitive Extracellular Vesicle Detection

Asuka KATAGIRI¹, Ryo ISHIHARA², Tadaaki NAKAJIMA¹, Kazuo HOSOKAWA³, Mizuo MAEDA³, Yasuhiro TOMOOKA¹, Akihiko KIKUCHI¹

¹Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci., Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan ²Fac. Med., Juntendo Univ., Inzai, Chiba, 270-1695, Japan ³Bioeng. Lab., RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan

²Tel: +81-476-98-1001, Fax: +81-476-98-1011, E-mail : r-ishihara@juntendo.ac.jp

表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた がん細胞由来細胞外ベシクルの検出

東理大院基礎工¹・順天堂大医²・理研前田バイオ³

○松井峻¹, 石原量², 中島忠章^{1*}, 片桐明日香¹,
細川和生³, 前田瑞夫³, 友岡康弘¹, 菊池明彦¹

【緒言】 がんは転移前に発見することがきわめて重要であり、早期発見のためのバイオマーカーは、これまで多く研究されている^[1]。その一つとして、細胞外ベシクル(EV)という細胞が恒常的に分泌する脂質二重膜から成る小胞体がある^[2]。特にがん細胞由来 EV は、その膜表面にがん転移に関与するインテグリンを高発現していることが報告されている^[3]。そのため、抗インテグリン抗体によりがん細胞由来 EV を検出することで、がん診断に繋がると期待できる。これまで我々は、表面機能化自律駆動マイクロチップ(SF-PF microchip)を用い、一般的な EV の短時間かつ簡便な検出に成功している^[4]。この手法を用いれば、がん細胞由来 EV を検出できると考えられる。そこで本研究では、SF-PF microchip を用いたがん細胞由来 EV の検出を目的とした。

【実験】 幅 100 μm , 高さ 25 μm , 検出部位の高さ 8 μm の流路を有する PDMS マイクロチップに、開始剤の benzophenone (10 wt% in acetone, 4 μL) を通液した。次に、2-aminoethyl methacrylate (AEMA) (0.5 mol/L in water, 6 μL) を通液後、UV (365nm, 100W) を 10 分間照射し UV グラフト重合した。次に、抗 integrin $\beta 1$ 抗体(0.01~0.50 mg/mL, 10 μL), 縮合剤の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (4.5 mg/mL, 1 μL) の混合溶液 2 μL で流路を満たし、37°C で 2 時間、湿度 100% で静置し、EV 捕捉用抗体を固定した。1 時間以上脱気し SF-PF microchip を得た。抗体固定量は、作製したマイクロチップに二次抗体 (Alexa594) を通液した後、顕微鏡下で蛍光観察することにより評価した。作製したチップに層流樹状増幅法^[5]を適用し、乳がん細胞 MDA-MB-231 由来 EV (5.0 nmol/L) を検出した。

【結果と考察】 流路内への抗体固定量は抗 integrin $\beta 1$ 抗体の濃度とともに増加し、0.50 mg/mL のときに最大となった。抗体濃度を 0.10, 0.25, 0.50 mg/mL とし EV を流した左側の流路 (signal), および EV を流していない右側の流路 (blank) の蛍光強度の比 (signal to blank ratio; s/b 比) を求めた結果、この s/b 比は抗体濃度が高くなるほど増加した。すなわち、s/b 比は抗体固定量に依存することがわかった。抗体濃度を 0.50 mg/mL とし左側の流路に EV を流した場合と EV を流さない場合で s/b 比を検出した結果を Fig. 1 に示す。EV の通液の有無で t 検定による 5% 水準で有意差があった。この結果から、がん細胞由来 EV の検出を実証できた。なお、検出にかかった時間は約 30 分であり、これまでに提案されている様々な EV 検出法^[6]よりも短かった。以上より、作製した SF-PF microchip のがん診断への応用が期待できる。

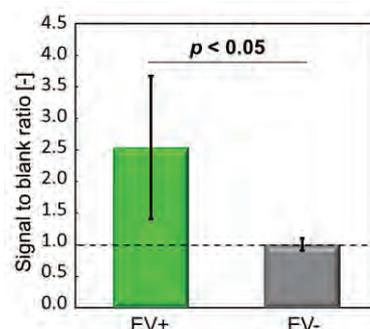


Fig. 1 Cancer cell-derived EV detection on the SF-PF microchip (n >= 3).

【参考文献】 [1] M. Pepe *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2001**, 93, 1054-1061. [2] E. Trams *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, 645, 63-70. [3] A. Hoshino *et al.*, *Nature*, **2015**, 527, 329-335. [4] R. Ishihara *et al.*, *ACS Omega*, **2017**, 2, 6703-6707. [5] K. Hosokawa *et al.*, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 6000-6004. [6] M. Verma *et al.*, *BMC Clin. Pathol.*, **2015**, 15. *現東大生産研

Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicle Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microchip
Ryo MATSUI¹, Ryo ISHIHARA², Tadaaki NAKAJIMA¹, Asuka KATAGIRI¹, Kazuo HOSOKAWA³, Mizuo MAEDA³, Yasuhiro TOMOOKA¹, and Akihiko KIKUCHI¹ ¹Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci., Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan ²Fac. Med., Juntendo Univ., Inzai, Chiba, 270-1695, Japan ³Bioeng. Lab., RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan

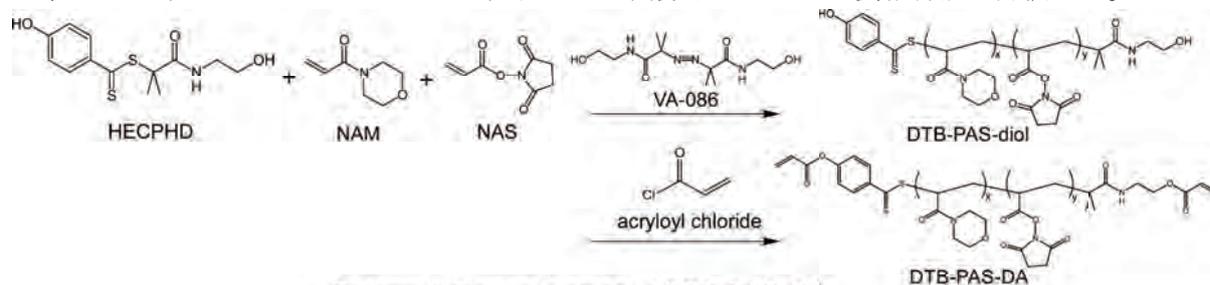
²Tel: +81-476-98-1001, Fax: +81-476-98-1011, E-mail: r-ishihara@juntendo.ac.jp

新奇連鎖移動剤を用いたタンパク質固定化用高分子の RAFT 重合とゲル形成特性評価

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻 ○森悠太 村上義彦

【緒言】タンパク質を固定化したデバイスは生体センサーとして病理診断システム等への応用が期待される。なかでも、ゲルはさまざまな機能性部位を組み込める空間を有し、膨潤・収縮可能であるなどの特徴を持つため、ミクロスケールの現象をマクロスケールに情報出力することに適したデバイスであると言える。近年、ゲル中に抗体や酵素などのタンパク質を組み込むことで、特定の分子を認識して体積変化を起こす分子応答性ゲルが注目されている。このようなゲルの実現には、ゲルネットワーク中に抗体や酵素などのタンパク質を固定化する技術が重要である。そこで本研究では、分子鎖中にアミノ基と反応する NHS エステルを有する、複数のタンパク質を固定化可能な高分子架橋剤を合成し、そのゲル形成能及びタンパク質固定化能を評価した。

【実験】タンパク質固定化用架橋剤の合成経路を以下に示した (Scheme 1)。末端にヒドロキシ基を有する新奇な連鎖移動剤 2-[*N*-(2-hydroxyethyl)carbamoyl]prop-2-yl 4-hydroxydithiobenzoate (HECPHD) とモノマー *N*-acryloylmorpholine (NAM)、*N*-succinimidyl acrylate (NSA)、及びラジカル開始剤 2,2'-azobis[2-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)propionamide] (VA-086) を 1,4-dioxane 中において 90°C で 5 時間攪拌し、RAFT 重合によって DTB-PAS-diol を合成した。さらに、合成した DTB-PAS-diol に対し acryloyl chloride と triethylamine を加え、dichloromethane 中において室温で 18 時間攪拌することで高分子末端をアクリロイル化し、高分子架橋剤 DTB-PAS-DA を合成した。合成した高分子架橋剤と、acrylamide、ammonium peroxodisulfate (APS)、及び tetramethylethylenediamine (TEMED) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 20 mM, pH7.4) 中で反応させることでゲルを調製した。また、PBS 中で DTB-PAS-DA に対してタンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) を反応させ、TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) 法により高分子のタンパク質結合能を評価した。



Scheme 1 Synthetic route of DTB-PAS-DA

【結果と考察】DTB-PAS-DA を高分子架橋剤として用いてゲルを形成することによって、反応開始から 30 分後にゲル化が完了したことをバイアル傾斜法によって確認した (Fig. 1)。この結果より、DTB-PAS-DA が架橋剤として機能することが確認された。また、TNBS 法により DTB-PAS-DA に対する BSA 上のアミノ基の反応率を算出したところ、活性エステルを有する NSA のモル比が高い DTB-PAS-DA の方がより高い反応率を示すことが確認された (Fig. 2)。したがって、NSA 由来の活性エステルがアミノ基と反応し、高分子上にタンパク質が固定化されたことが示唆された。



Fig. 1 Acrylamide gel containing DTB-PAS-DA as a cross-linker

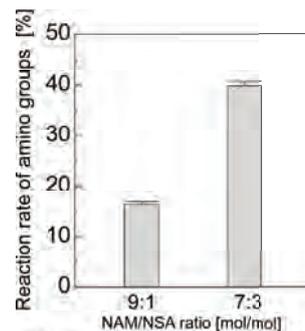


Fig. 2 The reaction rate of amino groups of DTB-PAS-DA

Synthesis of polymers for protein immobilization by using a novel RAFT agent and evaluation of their gelation properties

Yuta MORI, Yoshihiko MURAKAMI (Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakacho, Koganei, Tokyo 184-8588 Japan)

Tel/Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

ポストインプリンティング修飾ポリマー修飾チップによる前立腺特異抗原の高感度検出

¹神戸大学大学院工学研究科, ²安田女子大学薬学部

松本 大樹¹, 砂山 博文^{1,2}, ○高野 恵里¹, 北山 雄己哉¹, 竹内 俊文¹

【緒言】

バイオマーカータンパク質は特定の疾病においてその血中濃度が有意に変化するため、それらを高感度に検出するための分子認識素子は疾病の診断において重要な役割を果たす。バイオマーカータンパク質を検出する方法として、我々は、標的分子に対する特異的認識能をもつ人工高分子材料である分子インプリントポリマー (MIPs) の創出を行ってきた。さらに、MIP 中の分子認識空間内選択的に種々の官能基・分子を後天的に修飾することが可能なポストインプリンティング修飾 (PIM) を独自に開発し、本手法を用いた高感度タンパク質検出材料の創製に成功している[1-3]。本研究では、前立腺がんのバイオマーカーである前立腺特異抗原(PSA)を認識可能な MIP 薄膜を作製し、高感度検出を試みた。

【実験】

PSA に相互作用可能な安息香酸部位をもち、重合後に PSA 認識空間内にポストインプリンティング修飾 (PIM) を施すための 2 級アミン部位を併せもつ機能性モノマー 4-[2-(*N*-methacrylamido)ethylaminomethyl]benzoic acid を合成し、基板上に固定化した PSA を鋳型分子として MIP 薄膜を作製した。その後、低濃度で PSA を結合させることにより、高親和性空間のみを保護した後、第 1 のポストインプリンティング修飾(PIM)により、低親和性 PSA 認識空間内の機能性モノマー由来 2 級アミン部位にポリエチレングリコール修飾を施すキャッピング処理を行った。

【結果と考察】

キャッピング処理により、低親和性 PSA 認識空間が無効化され、MIP 薄膜の PSA に対する結合特異性の向上が確認された。すなわち、分子インプリンティングおよびそれに続くポストインプリンティング修飾が、高親和性・高選択性 MIP 薄膜の創製に有効であることが示された。さらに、第 2 の PIM により PSA の高親和性認識空間のみに特異的に蛍光分子の導入を行い、独自に開発した微小反応板内蔵ピペットチップ型センシングシステムを用いて、簡便に PSA の高感度蛍光センシングが可能かについて検討したので報告する。

[1] Takeuchi, T. et al. *Chromatography* **2016**, 37, 43-64

[2] Horikawa, R. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13023-13027.

[3] Takeuchi, T. et al. *Chem. Commun.*, 54, 6243-6251 (Feature article)

Sensitive Detection of Prostate Specific Antigen by Molecularly Imprinted Polymer Thin Films Prepared via Post-Imprinting Modification

Hiroki Matsumoto¹, Hirobumi Sunayama^{1,2}, Eri Takano¹, Yukiya Kitayama¹, Toshifumi Takeuchi¹

¹Graduate School of Engineering, Kobe University

² 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

抗体の配向制御と安定性向上を実現する新規抗体固定化法の開発

¹産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門

○山添 泰宗¹

【緒言】 抗体の優れた特異的結合能に着目し、多くの抗体固定化材料が開発され、目的物質の単離、標的指向型 DDS、病気の診断など幅広い分野で利用されている。様々な抗体固定化法が提案されているが、固定化した抗体の配向制御と安定性の向上は重要な課題である。近年、演者は、抗原を固定化した基板とタンパク質フィルムを利用した独自の手法により、抗体の配向制御と安定性向上を同時に実現する新しい抗体固定化法を確立した[1, 2]。しかし、この方法では、その工程で有機溶媒を用いており、作製した抗体固定化材料を生体に接触させて用いる場合には、残留溶媒による有害性が問題となる。そこで本研究では、前回の方法に改良を加え、有機溶媒など有害な化学薬品を用いない方法の確立に取り組んだ。

【実験】 末端にメチル基、または、ビオチン（抗原）を有するアルカンチオールを用いて、金基板上に自己組織化単分子膜を形成させ、抗原固定化表面を作製した（Figure 1）。この基板に抗ビオチン抗体を加えて、配向を制御した形で抗体を配列させた後、エチレンジグリコールジグリシジルエーテルで架橋したアルブミンの溶液を加えた。37℃で乾燥させてフィルムを作製後、基板を高温で加熱することにより、抗原と抗体を解離させ、基板からフィルムを剥離した。フィルムに固定化された抗体の抗原結合能は、ビオチン化 horseradish peroxidase (HRP) をフィルム内の抗体と結合させ、HRP の活性を蛍光試薬を用いて測定することで評価した。また、抗体固定化フィルムを乾燥状態にて 40℃で 1 ヶ月保存し、抗体の長期安定性を検証した。

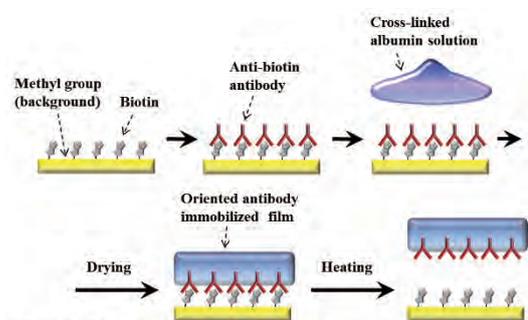


Figure 1. Schematic of the process for the preparation of an oriented antibody-immobilized albumin film.

【結果と考察】 本抗体固定化法では、抗原を固定化した基板を利用することで抗体の配向を制御している。また、抗体分子の抗原結合部分以外の大部分をフィルム成分（アルブミン）で取り囲むことで、変性条件下においても抗体の大きな構造変化を防ぎ、固定化した抗体の安定性向上を図っている。前回の方法ではエタノールに浸漬することで基板から抗体固定化フィルムを剥離していたが、本研究では加熱処理による剥離を試みた。剥離に適した温度を決定するため、様々な温度で加熱してフィルムを剥離した後、フィルムの抗原結合能とフィルムに移行せずに基板上に残存した抗体量を調べた。その結果、80℃から 120℃の間では、温度の上昇とともに、フィルムに移行する抗体量が増加、ならびに、基板上に残存する抗体量が減少し、抗体フィルムの抗原結合能が向上することが分かった。しかし、140℃で剥離したフィルムでは、抗原結合能の著しい低下が見られ、剥離温度は 120℃が最適であることが分かった。本抗体固定化フィルムとプロテイン G を用いて配向を制御して固定化した抗体の抗原結合能を比較した結果、プロテイン G 法よりも優れた抗原結合能を有することが分かった。さらに、本抗体フィルムは、乾燥状態にて 40℃で 1 ヶ月間保存した後でも抗原結合能が全く低下することなく、高い安定性を有していることが分かった。一方、基板上に抗体を共有結合で固定化した比較対象のサンプルでは、1 ヶ月の保存後、その抗原結合能が 8 割近く失われていた。

<参考文献>

1) Yamazoe H., *Biomaterials*, 155, 1-12 (2018).

2) 「抗体を含むタンパク質フィルム及びその製造方法」特願 2017-174215

Antibody immobilization technique using protein film for high stability and orientation control of the immobilized antibody

Hironori Yamazoe¹

¹ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Tel: +81-29-861-6264, Fax: +81-72-751-9517, E-mail: hironori-yamazoe@aist.go.jp

モレキュラービーコンによるアポトーシスの可視化

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 生体材料学分野
 ○村田 勇樹, 城 潤一郎, 田畑 泰彦

【緒言】

細胞移植治療において、生体内に移植された細胞のアポトーシスを非侵襲的にイメージすることは重要である。モレキュラービーコン (MB) は、両末端に消光分子と蛍光分子が結合した核酸誘導体であり、細胞内で様々な生物機能を制御する mRNA を汎用的に検出することができる。本研究では、細胞内で恒常的に発現するグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の mRNA を検出する MB (GAP MB) および、アポトーシス特異的に発現するカスパーゼ-3 の mRNA を検出する MB (casp3 MB) を用いた。生体吸収性高分子であるゼラチンからなるナノ粒子に MB を内包させ、細胞に取り込ませた。ナノ粒子を取り込んだ細胞にアポトーシスを誘導し、MB によるアポトーシスの可視化を試みた。

【実験】

ゼラチン (重量平均分子量 100,000、等電点 9.0、新田ゼラチン株式会社より供与) のカルボキシル基に対してスペルミンを結合させ、カチオン化ゼラチンを作製した。得られたカチオン化ゼラチンから、コアセルベーション法によりカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS) を作製し、GAP MB あるいは casp3 MB と室温で 15 分間混合 (20 pmole/ μ g cGNS)、遠心分離 (14,000 rpm、30 分間) によって MB 内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{GAP MB} および cGNS_{casp3 MB}) を作製した。得られたナノ粒子の見かけのサイズとゼータ電位は、動的光散乱法および電気泳動光散乱法によりそれぞれ測定した。

マウス間葉系幹細胞 (KUM6) をガラスボトムディッシュに播種し、24 時間培養した。無血清培地に交換後、cGNS_{GAP MB} あるいは cGNS_{casp3 MB} を細胞毒性の無い 10 μ g/ml の濃度で添加し、3 時間培養した。PBS によって細胞を洗浄し、さらに培養を続け、ナノ粒子添加 12 時間後に異なる濃度の camptothecin (1、2、5、10、および 20 μ M) を添加することでアポトーシスを 12 時間誘導した。アポトーシス誘導前後で細胞を蛍光顕微鏡にて観察し、得られた画像の蛍光強度を測定した。

【結果と考察】

cGNS_{GAP MB} と cGNS_{casp3 MB} の見かけのサイズとゼータ電位は、それぞれ 200 nm および +8 mV であった。

図 1 は、cGNS_{GAP MB} あるいは cGNS_{casp3 MB} を取り込んだ細胞のアポトーシス誘導後の蛍光強度測定結果である。cGNS_{GAP MB} を取り込んだ細胞の蛍光強度は一定であったのに対し、cGNS_{casp3 MB} では、アポトーシス誘導後でのみ、有意に蛍光強度が増加した。これは、アポトーシス誘導によって細胞内カスパーゼ-3 の mRNA が増加し、細胞質に導入された casp3 MB と反応したためであると考えられる。

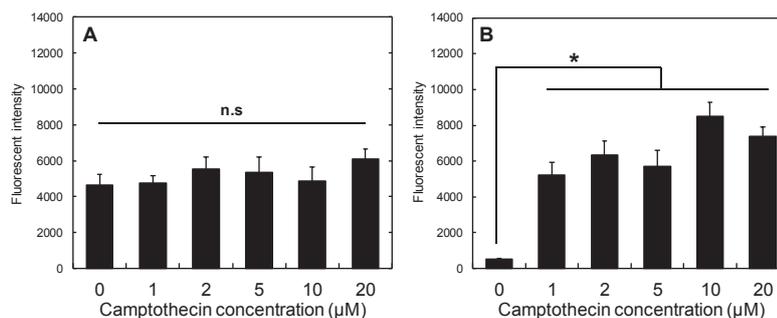


Figure 1. Fluorescent intensity of cells incubated with cGNS_{GAP MB} (A) and cGNS_{casp3 MB} (B) after the addition of different concentrations of camptothecin. n.s.; not significant. *, $p < 0.05$; significant difference against the fluorescent intensity of camptothecin-free original cells.

Visualization of apoptosis with molecular beacon

Yuki Murata, Jun-ichiro Jo, and Yasuhiko Tabata

Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Tel: +81-75-4108, Fax: +81-75-4646, E-mail: murata.yuki.63v@st.kyoto-u.ac.jp

多色深部イメージングを利用した腹膜組織における遺伝子発現・核酸送達評価法の開発

¹長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科, ²長崎大学病院 薬剤部

○西村 光洋¹, 萩森 政頼¹, 三浦 雄介¹, 麓 伸太郎¹, 兒玉 幸修², 佐々木 均², 川上 茂¹

【緒言】

腹膜線維症や腹膜への癌転移（腹膜播種）などの腹膜疾患に対する効果的な遺伝子・核酸治療のためには、これら疾患における DDS 開発および厳密な遺伝子発現・核酸送達の評価法が必要となる。我々はこれまで、血管や酸化ストレスなどの生体構造・環境と遺伝子発現の多色深部イメージングによる DDS 評価法を開発してきた。さらに、正常マウス腹膜に展開し、核・遺伝子発現・腹膜中皮細胞の 3 色同時観察に成功している¹⁾。しかしながら、腹膜疾患時は正常時とは組織構造や細胞形態が異なるため、腹膜疾患時に多色深部イメージングにより組織構造と遺伝子発現・核酸送達の空間的な位置関係を正確に評価可能かは不明である。腹腔内組織表面は、腹膜線維症の起因となる中皮細胞が存在し、腹膜播種の癌細胞の定着先である。そこで我々は、腹腔内組織表面と遺伝子発現・核酸送達の位置関係を明らかにすることが重要であると考えた。本研究では、組織表面細胞を染色し、腹膜線維症・腹膜播種における新規多色深部イメージング評価法の構築を行った。さらに、構築した評価法を用いて、各腹膜疾患モデルマウスの腹腔内組織への遺伝子・核酸導入法における遺伝子発現・核酸の組織内空間分布の評価を行った。

¹⁾ I. Nishimura K et al., *Drug Deliv.*, **24**(1),737-744 (2017)

【実験】

腹膜線維症モデルマウス作製のため、グルコン酸クロロヘキシジン連日投与を行った。その後、超音波応答性ナノバブルと超音波照射 (Frequency: 1.045 MHz, Intensity: 1.0 W/cm²) により pZsGreen1-N1 を導入した。また、腹膜播種モデルマウス作製のため、colon-26 細胞 (30 万個/200 μ L) を腹腔内投与した。癌細胞投与一定時間後、Alexa 647-VEGF siRNA/dendrigrift poly-L-lysine/ γ -polyglutamic acid 複合体 (nanoball) を腹腔内投与した。遺伝子・核酸導入後、脂溶性蛍光色素 (DiI) の腹腔内投与により組織表面細胞を染色し、組織透明化処理後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

【結果と考察】

脂溶性蛍光色素により腹膜疾患時にも腹腔内組織表面細胞を染色可能であり、組織表面の中皮細胞や癌細胞を観察可能であることが示された。そこで、腹腔内組織への遺伝子・核酸送達法に応用した。軽度腹膜線維症時では、ナノバブルと超音波照射により、腹腔内組織表面より下層で遺伝子発現が観察され、治療標的部位である中皮下層で遺伝子発現していることが示唆された。また、正常時の腹腔内組織において、nanoball 腹腔内投与ではほとんど siRNA の蛍光が観察されなかった。一方で、腹膜播種時では、癌細胞で siRNA の蛍光が観察され、nanoball 腹腔内投与により、癌細胞に siRNA が導入されていることが示唆された。このように、多色深部イメージング評価法は、腹膜線維症や腹膜播種といった腹膜疾患時において適用でき、腹膜組織にある細胞を標的とした標的指向型 DDS 開発において重要な方法論となり得ることが示唆された。

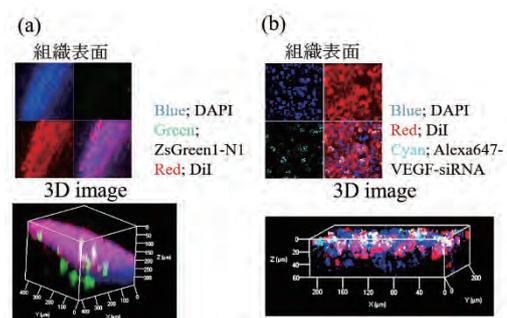


Figure 1. Multicolor deep imaging to peritoneal disease. (a) the distribution of transgene expression during mild peritoneal fibrosis. (b) the distribution of Alexa 647-VEGF siRNA in tumor nodule

Development of evaluation method for gene expression/nucleic acid delivery in peritoneal tissue using multicolor deep imaging: evaluation of peritoneal fibrosis and peritoneal dissemination model mouse
 Koyo Nishimura¹, Masayori Hagimori¹, Yusuke Miura¹, Shintaro Fumoto¹, Yukinobu kodama², Hitoshi Sasaki², Shigeru Kawakami¹

¹ Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University

² Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital

Tel: +81- 95-819-8563 , Fax: +81- 95-819-8563 , E-mail: bb55316404@ms.nagasaki-u.ac.jp

近赤外蛍光高分子ナノ粒子の第2の生体の窓を利用する in vivo イメージングへの応用

¹東京理科大学基礎工学部, ²東京理科大学イメージングフロンティアセンター
○上村 真生^{1,2}, 吉田 萌¹, 梅澤 雅和¹, 曾我 公平^{1,2}

【緒言】

In vivo 蛍光イメージングは、生体内情報をリアルタイムに可視化できるため、現代の生命科学において欠かすことができない観察技術である。この in vivo 蛍光イメージングにおいて、特に近年、波長が 1000 nm を越える近赤外 (over-1000 nm (OTN)-NIR) 光が、生体組織透過性に優れることが明らかとなっており、積極的なイメージング応用が検討されている。しかしながら、OTN-NIR 蛍光を発する蛍光プローブのほとんどは、量子ドットやカーボンナノチューブなどの金属・無機ナノ物質であり、毒性や使用後の体外への排出などが問題となっている。そこで本研究では、OTN-NIR 蛍光を発し、腎排泄可能な分子サイズの低分子有機蛍光色素を、親水性の poly(ethylene glycol) (PEG) の片末端に疎水性の DSPE を有するポリマー (PEG-DSPE) からなるポリマーミセルのコア部に内包することで、OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルを作製し (Fig. 1), マウスの in vivo イメージングを行った。

【実験】

PEG (2k)-DSPE と OTN-NIR 蛍光色素 (IR-1061) をアセトニトリル中に溶解し、純水を加えて大気中で攪拌することでアセトニトリルを除去した後、遠心フィルター精製することで OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルを作製した。この OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルを生理食塩水中に分散させ、マウス (ICR, 雌, 6 週齢) の尾静脈に投与し、OTN-NIR 蛍光イメージングシステムを用いて in vivo イメージングを行った。

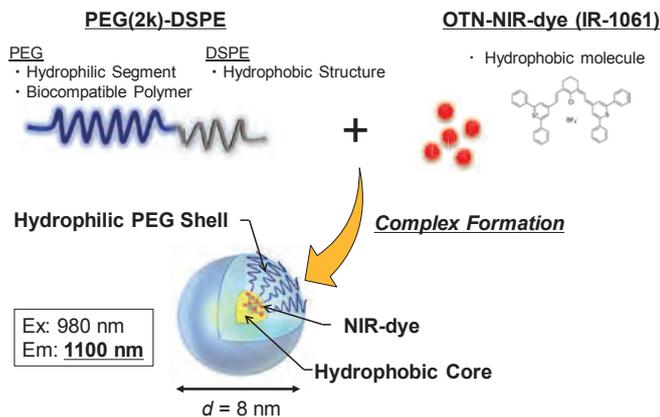


Fig. 1 OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルの設計。

【結果と考察】

動的散光測定の結果、平均粒径約 8 nm の OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルが形成されていることがわかった。この OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルの蛍光スペクトルを測定 (980 nm 励起) したところ、IR-1061 のみを HEPES 緩衝液中に添加した際には蛍光を確認することができなかったのに対して、OTN-NIR 蛍光ポリマーミセル溶液は波長約 1100 nm の強い OTN-NIR 蛍光を示した。これらの結果から、IR-1061 をポリマーミセルに内包することで、水中において分散・発光が可能になることが明らかとなった。さらに、この OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルをマウスに尾静脈投与することで in vivo イメージングを試みた。この結果、マウスが生きのまま解剖することなく、体内の血中に存在する OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルの発する OTN-NIR 蛍光を、体外から観察することに成功した。これらの結果から、IR-1061 をポリマーミセルに内包することで、水中において高い分散安定性と安定した発光特性を有し、in vivo イメージングに利用可能な蛍光プローブを作製することに成功した。

Application of Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles for *in vivo* Imaging in the Second Biological Window

Masao Kamimura¹, Moe Yoshida^{1,2}, Masakazu Umezawa¹, Kohei Soga¹

¹Department of Materials Science and Technology, Tokyo University of Science

²Imaging Frontier Center, Tokyo University of Science

Tel: +81-3-5876-1414, E-mail: masaokamimura@rs.tus.ac.jp

蛍光標識材料や蛍光標識型バイオセンサー等への応用を見据えた新規蛍光発光材料の開発

¹ミヨシ油脂㈱, ²岐阜大学

○矢下 亜紀良¹, 川上 隼人¹, 河合 功治¹, 竹腰 和馬², 村井 利昭²

【緒言】

現在、蛍光発光物質は有機 EL ディスプレイ分野で注目される中、生物分野では、分子イメージングプローブ、バイオセンサーでタンパク質、核酸などの生体分子の染色または化学的標識に用いられている。蛍光色素で化学的に標識された特異的抗体などの精製生体分子は、セルイメージングなどの実験における蛍光プローブとして、標的抗原や相互作用パートナーの検出に利用されている。また、バイオセンサーでは、蛍光タンパク質等の蛍光物質を利用した蛍光標識型バイオセンサー等が注目を集めている。

今回、我々はチアゾール骨格の特定部位に窒素原子を含む官能基を導入し新規蛍光発光材料の有機アミノチアゾール化合物を合成した。これらの化合物には、上記蛍光標識材料に必要なとされるタンパク質結合性官能基であるアミノ基やカルボキシル基が導入された化合物や水溶性の化合物が含まれる。その他の化合物においても、光学特性（蛍光励起・発光スペクトル、蛍光発光収率、ストークスシフト等）において興味深い物性が得られた。得られた化合物は蛍光標識材料、バイオセンサーをはじめとする生物分野だけでなく、様々な分野で有用であり応用を見据えている。

【実験】

種々のアミノチアゾール化合物の合成を行った。合成は合計 3 ステップまたは 4 ステップから成る。ステップ 1 では、チアゾール環の第 2 位へのヨウ化物を用いた選択的アリール化により中間体を得た。続いてステップ 2 では、チアゾール環の第 5 位への NBS による選択的臭素化を行い、最終ステップとして、ステップ 2 で得られた臭素化合物と 2 級アミン化合物とをブッフバルト・ハートウィッグ反応で結合させ最終生成物である種々のアミノチアゾール化合物を得た。

得られたアミノチアゾール化合物に関して、UV-Vis スペクトル、蛍光スペクトル等より光学特性を評価した。

【結果と考察】

ブromoチアゾール化合物とアミン化合物より種々アミノチアゾール化合物を得た。例えば、タンパク質結合性官能基であるアミノ基やカルボキシル基を有するアミノチアゾール化合物である。アミノ基やカルボキシル基を修飾することで、脂溶性のコントロールや特定部位への集積を期待している。その他、アミノチアゾール化合物は、導入するアミン化合物の置換基等で蛍光発光波長のチューニングが可能であり、蛍光極大波長が青色、緑色、赤色とそれぞれ異なるアミノチアゾール化合物が得られた。いずれもストークスシフトは約 90nm 以上であり自己吸収が抑えられた化合物であり、特に青色、緑色化合物は量子収率が高い物性を有している。詳細は、当日のポスターで報告する。

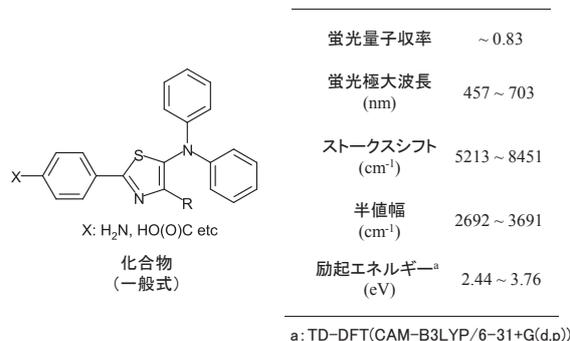


Figure 1. Structure of the compounds and evaluation results.

Biomaterials: Development of new fluorescence materials in anticipation of the applications to fluorescent labeling materials and biosensor and so on.

Akira Yashita¹, Hayato Kawakami¹, Koji Kawai¹, Kazuma Takegoshi², Toshiaki Murai²

¹ MIYOSHI OIL & FAT CO., LTD.

² Gifu University

Tel: +81-3-3602-8791, Fax: +81-3-3690-3542, E-mail: YASHITAA@so.miyoshi-yushi.co.jp

体内植込み型医療デバイスコーティング材を目指した長期持続型抗菌ナノ粒子の開発

¹近畿大学大学院生物理工学研究科, ²奈良先端科学技術大学院大学

○石丸 佳樹¹, Nalinthip CHANTHASET², 網代 広治², 東 慶直¹, 古菌 勉¹

【緒言】我が国では、平成 27 年に抗生物質を担持した中心静脈カテーテルが上市されたが、薬剤耐性菌発現の恐れによりその使用は厳しく制限されている。カテーテル関連感染症に限らず、抗生物質の多用による新たな薬剤耐性菌の発現は回避すべき課題である。近年、抗生物質に代わる抗菌材として、幅広い抗菌スペクトルを示す銀ナノ粒子の臨床応用が期待されている。銀ナノ粒子の抗菌効果は薬剤耐性菌に対しても良好であり、表面から徐々に銀イオンがリリースすることで長期間効果が持続するとの報告がなされている。ただし、銀ナノ粒子は強い抗菌性を有するため、体内での使用には十分な検討が必要である。そこで本研究では、抗菌性の制御および長期的な抗菌効果の持続を目的として、表面を有機物で保護された銀ナノ粒子を創出した。更に、水分散性および基材との反応性を向上させるために、表面に親水性基を導入し、カテーテル感染起因菌に対する抗菌性を評価したので報告する。

【実験】表面を保護された銀ナノ粒子の合成は、銀源、不飽和脂肪酸、還元剤を用いて窒素気流下で行われた。ナノ粒子の合成時に、反応時間および保護材の添加量を調節することで粒径制御を検討した。当ナノ粒子の同定には、TEM、XRD、UV-Vis、FT-IR、TG などを用いた。さらに、チオールエン反応によって表面のビニル基に水酸基を導入して親水性を向上させ、大腸菌 (W3310 株) に対する抗菌性試験を粉末添加法によって実施した。

【結果と考察】XRD 測定により銀の結晶構造 (面心立方格子構造) に由来するピークが確認された。加えて、UV-Vis 測定により表面プラズモン共鳴による吸収が認められたことから、生成物は銀ナノ粒子であることが認められた。合成工程において反応時間および保護材の添加量を調節することで、ナノ粒子は約 4~10 nm の間で粒径制御が可能であることが TEM 観察により見出された。また、TEM 像より粒子間距離を測定した結果、金属層の表面に有機物の単一層が形成されていると考えられた。FT-IR 測定結果から、当該ナノ粒子には不飽和脂肪酸が含まれることが認められた。還元剤であるステアリルアミンは銀ナノ粒子に対する吸着力が弱いために、保護材添加時に離脱すると考えられた。TG 測定結果により、保護材の添加量によって有機物含有量が制御され、銀源に対して十分な量の保護材を添加した場合、約 16~18 wt% の有機物を含むことが認められた。チオールエン反応によって水酸基を導入したところ、水分散性の向上が認められた。当ナノ粒子を用いて抗菌性試験を実施した結果、大腸菌に対して高い抗菌性を示し、その抗菌性は濃度によって制御されることが示された (Fig. 1)。不飽和脂肪酸のみで保護された銀ナノ粒子では全く抗菌性が認められなかったことから、親水性を付与し分散性を向上させることが抗菌活性の発現に効果的であることが明らかとなった。

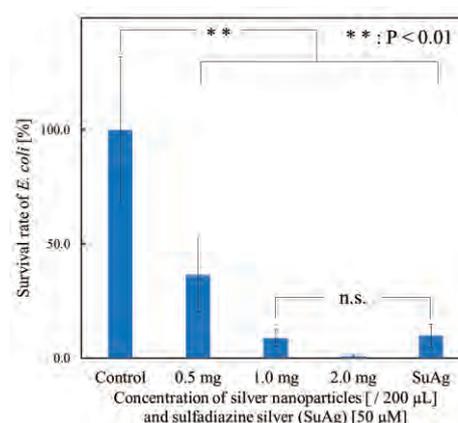


Fig.1 The result of the antibacterial test against *E. coli* (n=4)

Development of long-lasting antimicrobial nanoparticles for coating materials on implantable medical devices

Yoshiki Ishimaru¹, Nalinthip Chanthaset², Hiroharu Ajiro², Yoshinao Azuma¹, Furuzono Tsutomu¹

¹Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University.

²Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology.

Tel: +81-0736-77-3888, Ext: 5206, E-mail: furuzono@waka.kindai.ac.jp

Ti ベース合金の臨床応用実現に向けた医工学的検討

¹東北大学大学院歯学研究科, ²東北大学大学院医工学研究科
 ○王 銳^{1,2}, 横田 琴音¹, 古谷 真衣子¹, 金高 弘恭^{1,2}, 菊池 雅彦¹

【緒言】

Ti および Ti 合金は軽量, 高強度, 非磁性, 耐食性, 低アレルギー性など優れた特性を有している。NiTi 合金は, 安定した形状記憶効果と超弾性特性を有していることから, 卓越した機能性生体材料として広く利用されている。しかし, Ni は高いアレルギー性や発癌性があることが報告されているため, Ni を含まない新しい形状記憶合金の開発が望まれていた。そこで本研究では, Ni などの生体為害性の高い元素を含まず, 生体材料としての生体安全性の高い金属元素から構成される新しい合金を開発し, 新合金の臨床応用実現に向け, 医工学的手法を用いて, 多角的に検討を行うことを目的とした。

【実験】

本研究においては, Ti₄Au₅Cr₅Ta 合金, Ti₃₂Au₁₆Co₁Nb 合金, および Au₂₈Cu₂₂Al 合金をサンプルとして使用した。これらの合金の臨床的有用性を確認するために, 下記の項目において, 現在, 広くインプラント材料として使用されている純 Ti, および, 従来型の形状記憶合金である NiTi 合金との比較を行い, 新合金の耐食性に関する評価を行った。

耐食性評価として, アノード分極試験 (Fig. 1) による耐食性試験を実施した。人口唾液は Fusayama saliva を参照にして作製した。フッ素洗口液としては 900ppmNaF 洗口液 (昭和薬品化工) を使用する。サンプルは直径 15 mm のプレート状とし, 試験片表面は, 耐水研磨紙 #120 から始め, 順次番数を上げ, 最終的に #2000 を用い, 流水下で研磨を行った。研磨後エタノールで 10 分間超音波洗浄した。新合金の耐食性評価としては, 人口唾液中, フッ素洗口液, 人口唾液とフッ素洗口液の混合液中にてそれぞれ①アノード試験を実施した。また, 試験前後において②XRD 解析, ③XPS 解析, ④SEM による表面分析観察測定を行い, それぞれ比較検討した。

【結果と考察】

耐食性については, それぞれの新合金と既存の純チタン及び NiTi 合金の人口唾液及びフッ素洗口液による耐食性への影響を調べるために, それぞれの溶液中における電気化学的腐食挙動をアノード分極試験により評価した。結果, 人口唾液中においては, Au₂₈Cu₂₂Al 合金以外の新合金の自然浸漬電位は, NiTi 合金及び純 Ti より高い値を示した。人口唾液+フッ素洗口液中やフッ化洗口液中においては, それぞれの新合金は NiTi 合金より低い値を示したが, 純 Ti と同等な値であった。また, 過不動態溶解開始電位は それぞれの溶液中においては, それぞれの新合金は純 Ti より高い値を示した。なお, NiTi 合金との比較はさらなる検討を必要とした。①これらのことから, それぞれの新合金は, 口腔内環境を模擬したそれぞれの溶液中での耐食性に優れていることが確認された。②SEM 像では, いずれの合金も均一な研磨面が認められ, 人口唾液, フッ素洗口液, 人口唾液+フッ素洗口液中の順に孔食像が多く認められ, 新合金は Ti より孔食像が少なく, アノード試験結果同様, 耐食性に優れていることが確認された。③XRD の結果については, 新合金は, それぞれの溶液中においては, NiTi 合金, 純 Ti よりピーク強度やピーク位置の変化が少なく, 耐食性に優れていることが確認された。なお, ④XPS の結果については, さらなる検討が必要と考えられた。



Biomedical engineering evaluation of Ti-base alloy for medical use

Rui WANG^{1,2}, Kotone YOKOTA¹, Maiko FURUYA¹, Hiroyasu KANETAKA^{1,2}, and Yasuhiko Kikuchi¹,

¹Tohoku University Graduate School of Dentistry

²Tohoku University Graduate School of Biomaterial Engineering

Tel: +81-022-717-8434, Fax: +81-022-717-8434, E-mail: rui.wang.r4@dc.tohoku.ac.jp

抗感染性バイオナノセラミックスの調製および抗菌メカニズムの検討

¹近畿大学大学院生物理工学研究科, ²(株)ソフセラ技術開発センター
○大下 真璃¹, 小粥 康充², 上向井 徹², 東 慶直¹, 古菌 勉¹

【緒言】

腹膜透析(PD)は腎代替療法の 1 つであり、PD カテーテルにおける出口部感染(ESI)とそれに伴う腹膜炎の発症は解決すべき喫緊の課題となっている。事実として、ESI の発症率は約 22%という報告もなされている。これまでに我々は、カフにハイドロキシアパタイト(HAp)ナノ粒子をコーティングしたプロトタイプカテーテルを作製し、ポリエステル製カフ付きのものと比較したところ、感染阻止率が 9 倍向上することを見出した。

本研究室では、さらなる感染阻止率の向上を目指して、HAp に亜鉛(Zn)を置換した亜鉛置換 HAp(Zn-HAp)ナノ粒子を調製し、材料特性評価および抗菌活性評価を実施した。加えて、その抗菌メカニズムについて検討したので報告する。

【実験】

Zn-HAp ナノ粒子は硝酸カルシウム四水和物、硝酸亜鉛六水和物およびリン酸水素二アンモニウムを混合し、湿式法にて調製した。仮焼前のサンプルに融着防止処理を施すことにより、仮焼時におけるナノ粒子の焼結を抑制した。また XRD、FT-IR、ICP-OES および SEM を用いて、材料特性評価を行った。

Zn-HAp ナノ粒子が有している抗菌活性を評価するため、カテーテル感染起因菌に対する抗菌性試験を実施した。PET シートに Zn-HAp ナノ粒子をコーティングし、OD₆₀₀=0.01 に調製した菌液を塗布した。1 時間後、10 倍希釈を 5 回行い、LB 寒天培地にスポットした。37°C のインキュベータで 15 時間培養し、コロニー数を計測することで細菌の生存率を算出した。また、抗菌メカニズムの検討として、塩化亜鉛水溶液を OD₆₀₀=1.0 に調製した大腸菌に添加し、1 時間接触させた。3 回の遠心分離により余分な Zn²⁺を除去し、菌体内に含まれる金属イオン濃度を ICP-OES により測定した。

【結果と考察】

Zn 置換率が異なる 4 種の Zn-HAp ナノ粒子を調製した。XRD および FT-IR より、HAp に由来する構造を有していることが認められた。XRD プロファイルから得られた格子定数の算出結果より、Zn 置換率が増加するにつれて、格子定数の減少が認められた。これは、Zn²⁺イオン半径(0.74Å)が Ca²⁺(1.00Å)より小さいことによるものと考えられた。また、ICP-OES 測定より Zn は仕込みの約 90%が置換されていた。これらのことから、Zn は HAp 構造中の Ca と置換されていることが示唆された。SEM 観察より、Zn-HAp ナノ粒子は PET シートに単層かつ均一にコーティングされていることが認められた。

抗菌性試験の結果より、Zn-HAp ナノ粒子をコーティングしたシートでは、HAp ナノ粒子をコーティングしたシートと比較して有意な抗菌性が認められた(図 1)。大腸菌と接触することで、接触界面での Zn²⁺濃度が上昇したことにより抗菌性が現れたと考えられた。また、塩化亜鉛水溶液を大腸菌に添加すると、菌体内の Zn²⁺が増加し、Mg²⁺が減少することを見出した。このことから、大腸菌内の様々な酵素や構造中の Mg²⁺が Zn²⁺に置換されることで、細胞の酵素反応に攪乱が生じ、抗菌性が認められたと推察された。

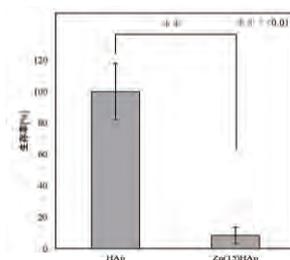


図 1. 大腸菌の生存率

Preparation of Anti-infective bio-nanoceramics and investigation of antibacterial mechanism

Mari Oshita¹, Yasumichi Kogai², Toru Uemukai², Yoshinao Azuma¹, Tsutomu Furuzono¹

¹Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University

²SofSera Corporation

Tel: +81-0736-77-3888, E-mail: furuzono@waka.kindai.ac.jp

オリゴプロリン自己組織化集合膜の表面特性と機能評価

¹関西大学大学院理工学研究科、²関西大学先端科学技術推進機構
○埜口 友里¹、平野 義明^{1,2}、柿木 佐知朗^{1,2}

【緒言】人工血管や人工心臓の長期埋入時における血栓形成や慢性炎症などの合併症は未だ克服されていない。これらの要因と考えられる、バイオマテリアルと生体組織との接触時に惹起される非特異的なタンパク質吸着、血小板や細胞の粘着をいかにして防ぐかが重要となる。そこで我々はバイオマテリアル界面に生体不活性（バイオイナー）な生体分子の固定化がその防止に有効と考え、細胞外マトリクスの主要タンパク質であるコラーゲンの分子模倣に着目した。コラーゲンは細胞接着部位とそれ以外の構造骨格部位（(Gly-Pro-Hyp)_n）で構成されている。構造骨格部位は、細胞接着部位の生理的な機能を阻害することなく細胞と相互作用する場を提供していることから、バイオイナーな性質を有しているであろうと仮説を立てた。本研究では、構造骨格部位のアミノ酸配列をモデル化したオリゴプロリンを固定化した自己組織化膜を作製し、*in vitro*における線維芽細胞の接着性を評価した。

【実験】鎖長の異なる2つのオリゴプロリン(Ac-Cys-(Pro)_n-CONH₂; n=6 (Pro6) and n=9 (Pro9))をFmoc固相法で合成した。金蒸着ガラスをPro6もしくはPro9の水溶液に2時間浸漬し、オリゴプロリン固定化SAMを作製した。オリゴプロリン固定化SAM(OP-SAM)表面での化学構造や状態を高感度反射法(IR-RAS)で、水濡れ性を水接触角計でそれぞれ解析した。さらに、F-アクチン可視化マウス胎児線維芽細胞(NIH/3T3-RFP)をOP-SAM上に播種し、所定時間後に接着形態を観察した。さらにアミノ基を末端に持つ3-メルカプトプロピルアンモニウムクロリド(MPAC)とPro6もしくはPro9との混合SAMを作製し、その表面へのNIH/3T3-RFPの接着挙動を評価した。

【結果と考察】Pro6、Pro9ともにCDスペクトルで205 nm付近に負のコットン効果と226 nm付近に正のコットン効果が検出されたことから、コラーゲン骨格構造と同様のポリプロリンII(PP-II)ヘリックスを形成することが分かった。Pro9は、より強いコットン効果を示したことから、Pro6よりも安定なPP-IIヘリックスを形成することが分かった。OP-SAM表面のIR-RAS解析では、プロリン残基のC-N伸縮振動に由来する1438 cm⁻¹のピークと、プロリン残基間ペプチド結合のN-H変角振動およびC-N伸縮振動に由来する1310 cm⁻¹のピークがそれぞれ検出された。また、OP-SAM表面の水接触角は35°で比較的親水性であった。これらの結果から、オリゴプロリンが金薄膜ガラス表面に固定化できたと考えられる。さらに、OP-SAM表面に細胞を播種したところ、細胞はほとんど接着しなかった。さらに、濃度を変化させた混合SAM上では、オリゴプロリンの割合が増加するにつれて細胞接着が抑制された。これらの結果から、コラーゲンらせん骨格構造を模倣したPro6およびPro9がバイオイナーな生体分子として有用である可能性が示唆された。

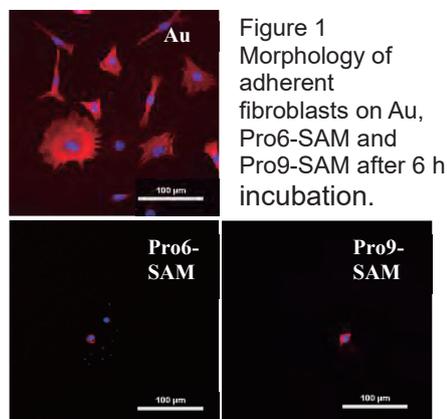


Figure 1
Morphology of
adherent
fibroblasts on Au,
Pro6-SAM and
Pro9-SAM after 6 h
incubation.

【謝辞】OP-SAMの作製においてご協力頂きました、関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科 岩崎泰彦 教授と上田正人 教授に深く御礼申し上げます。

Evaluation of Cell Adhesion Behavior on Oligoprolin Self-assembling Monolayers

Yuri NOGUCHI¹, Yoshiaki HIRANO^{1,2} and Sachiro KAKINOKI^{1,2,*}

¹Department of Chemistry and Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Materials and bioengineering, Kansai University, Osaka 564-8680, Japan, ²ORDIST, Kansai University, Osaka 564-8680, Japan
Tel & Fax: 06-6368-3033, *e-mail: sachiro@kansai-u.ac.jp

フィラー/マトリックス界面に超分子結合を導入したコンポジットハイドロゲル

¹大阪大学大学院工学研究科, ²大阪大学大学院理学研究科
 ○菅原 章秀¹, 麻生 隆彬¹, 高島 義徳², 原田 明², 宇山 浩¹

【緒言】 セルロースナノファイバー (CNF) は分子間の強い水素結合により高い結晶性を有しているため、軽量でありながら高い力学強度を示し、複合材料のフィラーとしての利用が期待されているバイオマテリアルである。本研究では、フィラー/マトリックス界面にホスト分子である β -cyclodextrin (β -CD) とゲスト分子である adamantane (Ad) との間で形成されるホスト-ゲスト相互作用による超分子結合が導入された複合材料を作製した。ゲスト分子である Ad は CNF ファイバー表面の水酸基に化学修飾した。ホスト分子 β -CD は、ビニル基を有する誘導体を合成し、主鎖を構成するモノマーと共重合することでマトリックスに導入した。フィラー/マトリックス界面に超分子結合による物理架橋点を有するハイドロゲルを作製し、その力学強度を評価した。

【実験】 粉末セルロースを水中対向衝突法により解繊し、CNF 水分散液を調製した。この分散液の媒体を有機溶媒に置換した CNF 分散液を調製し、CNF の水酸基とアダマンタン誘導体のカルボン酸との脱水縮合反応により、Ad 修飾セルロース (Ad-Cellulose) を作製した (Fig. 1A)。さらに、分散液の媒体を水へ置換し、Ad-Cellulose 水分散液を調製した。ビニル基を有する β -CD 誘導体を合成し、フィラー/マトリックス界面に超分子結合を有するハイドロゲルは Ad-Cellulose 存在下で β -CD モノマーと 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) を共重合することで作製した (Fig. 1B)。まず、Ad-Cellulose 水分散液に β -CD モノマーを溶解しアダマンチル基に β -CD モノマーを包接させた。そして、マトリックスである HEA およびラジカル重合開始剤を添加し重合を行うことでハイドロゲルを作製した。このゲルを水に含浸することで洗浄を行い、ゲルは平衡膨潤状態に達するまで水に浸漬した。

【結果と考察】 Ad-Cellulose 水分散液に β -CD を添加すると分散液の粘度が上昇した。これは Ad-Cellulose のアダマンチル基に β -CD が包接したことを示している。 β -CD の添加により Ad 間の疎水相互作用により凝集した Ad-Cellulose の疎水基が β -CD で被覆されることで水への分散性が向上したため、粘度が上昇したと考えられる。Ad-Cellulose をフィラーとして作製したゲルの外観はセルロースが微分散することで半透明であった。超分子結合を導入したコンポジットハイドロゲルの物性評価は引張試験により行った。超分子結合を有するゲルは β -CD モノマーを添加せずに超分子結合を導入せずに作製したものと比較して破断応力が向上した。 β -CD モノマーの添加量の増加にしたがいゲルの破断応力は上昇し、 β -CD モノマーを全モノマーの物質質量に対し 2.0mol% 添加した場合、添加していないゲルのおよそ 1.8 倍の破断応力となった。これは、超分子結合がゲルの物理架橋点として作用していることを示している。超分子結合の阻害剤である 1-admantanamine hydrochloride と β -CD の水溶液をそれぞれ調製し、これらにゲルを浸漬させることで阻害実験を行った。阻害剤浸漬後のゲルの力学強度を引張試験により評価したところ、浸漬前と比較して破断応力が低下した。これは阻害剤がフィラー/マトリックス界面の超分子結合に競争的に包接し、ゲルの架橋点が切断されたためである。これらのことより、フィラー/マトリックス界面に超分子結合を導入することでハイドロゲルの力学強度を向上することが可能であった。

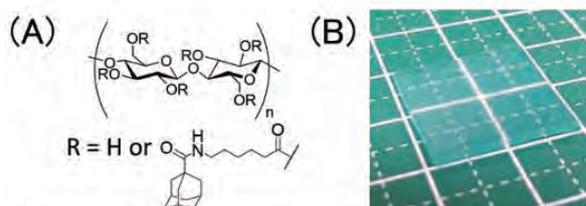


Figure 1. (A) Chemical structure of Ad-Cellulose and (B) Image of the composite hydrogel.

A composite hydrogel possessing supramolecular bonding between filler and matrix

Akihide SUGAWARA¹, Taka-Aki ASOH¹, Yoshinori TAKASHIMA², Akira HARADA², Hiroshi UYAMA¹

¹ Graduate School of Engineering, Osaka University ² Graduate School of Science, Osaka University

Tel: +81-6-6879-7365, Fax: +81-6-6879-7367, E-mail: a_sugawara@chem.eng.osaka-u.ac.jp

芯鞘エレクトロスピニング法によるナノファイバー表面へのタンパク質掲示

¹ 福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻, ² 福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構

○森山 幸祐¹, 末 信一郎^{1,2}, 藤田 聡^{1,2}

【緒言】酵素やタンパク質リガンドを用いたバイオリクターでは、高効率での反応や、生成物の簡便な分離を可能とするため、タンパク質を表面に固定化した多孔体やマイクロビーズ、膜等の担体材料が使用されてきた。昨今、より比表面積の高い材料としてナノファイバー不織布が着目されている。従来の多孔質担体に比べ、高い空隙率を有しているため、反応液を高流速かつ大容量で流すことが可能となり、バイオリクター用の担体への応用が期待される。ナノファイバー不織布表面へのタンパク質の固定化については、従来の繊維技術に用いられてきた多ステップから成る表面処理が適用されてきたが、煩雑かつ時間がかかり、繊維材料奥深くの処理が施しにくいという課題があった。工業的利用を想定すると、タンパク質の生理活性を損なわずに、簡便かつ均一に固定化する手法が強く望まれる。そこで本研究では、エレクトロスピニング法によるナノファイバー作製と、繊維表面へのタンパク質の固定化を同時にワンステップでおこなう手法を検討した。エレクトロスピニング法では、高電圧に印加したポリマー溶液をアースされたコレクタに射出することで、均一なナノファイバーを簡便に得ることができる。今回、タンパク質を繊維表面に掲示するために、芯鞘型ノズルを介して芯・鞘それぞれに独立して別のポリマー溶液を射出する芯鞘型エレクトロスピニングを利用した新規な手法を検討した。すなわち、芯材の表面がタンパク質を含む鞘材で覆われた芯鞘ナノファイバーを紡糸することで、紡糸と同時にタンパク質を表面に掲示・固定化することを試みた。基布となるポリマーには酢酸セルロース(CA)を用い、鞘材にはポリビニルアルコール(PVA)を用いた。

【実験】<タンパク質を表面掲示した芯鞘ナノファイバーの作製>芯鞘ファイバーの作成は芯鞘型ノズルを用いたエレクトロスピニング装置 (MECC 社) によって作成した。芯層には CA 溶液を、鞘層にはタンパク質およびカルボジイミドを含有する PVA 溶液を用いた。これらの溶液に電界 2.5 kV/cm を印加しながら、鞘 2.0 ml/h、芯 1.0 ml/h で射出し、回転式ドラムコレクタ上で回収することで、タンパク質が表面に掲示・固定化されたナノファイバーシートを得た。

<芯鞘ナノファイバーのキャラクタライズ>得られたナノファイバーの形態観察は光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡(SEM)及び透過型電子顕微鏡(TEM)によりおこなった。ナノファイバー表面に掲示されたタンパク質は、抗体を用いた免疫染色をおこない蛍光顕微鏡で観察した

【結果と考察】作製したナノファイバーの TEM 画像(Fig. 1A)に示す通り、細いファイバー径を有するファイバーが得られ、その表面に均一な PVA の薄層が観察された。作製したシートを免疫染色し蛍光顕微鏡観察をおこなったところ(Fig. 2B)、表面に均一にタンパク質が固定化されていることが示された。免疫染色のプロセスでは水溶液に 1 日以上シートが浸漬されるが、その際もファイバー形態は維持された。以上に示す通り、芯鞘型エレクトロスピニング法を用いたタンパク質の繊維表面への簡便な固定に成功した。本手法は、ナノファイバーを用いたバイオリクターへの利用可能なリガンド固定化技術として期待される

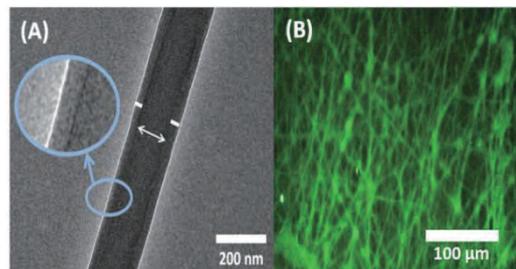


Fig. 2 (A) TEM image of fabricated nanofibers. (B) Fluorescent image of protein-immobilized fibers.

Display of protein on nanofiber surface by using core-shell electrospinning

Kosuke MORIYAMA¹, Shin-ichiro SUYE^{1,2}, Satoshi FUJITA^{1,2},

¹ Department of Frontier Fiber Technology and Science, University of Fukui ² Life Science Innovation Center, University of Fukui

Tel: +81-776-27-9969, Fax: +81-776-27-8747, E-mail: fujitas@u-fukui.ac.jp

表面酸化反応による生分解性ポリエステル機能化

1 大阪大学大学院工学研究科, ²Universiti Sains Malaysia○呉 威廷¹, 浅原 時泰¹, 麻生 隆彬¹, K. Sudesh Kumar², 宇山 浩¹

【緒言】ポリ乳酸 (PLA) やポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) などの生分解性ポリエステルは高い生体適合性を有することからバイオマテリアルとして注目を集めている。しかし、これらは汎用性プラスチックと同様に疎水性であるから、生体と接して用いる場合に水分を多く含む軟組織との親和性に課題がある。また、PLA は温度や湿度、pH の影響により加水分解が起こるが、その分解速度を制御する手法の開発が求められている。一方、PHA の中でもポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシヘキサノエート) (PHBH) は、PLA と比較すると柔軟性である反面、機械強度が弱いこと、応用が制限されている。

本研究では、二酸化塩素ラジカルへの光照射により生じる活性種を用いた新規酸化法を PLA や PHBH などの生分解性ポリエステル表面に適用することで、酸素官能基を導入し、表面の親水性および、細胞親和性の向上を企画した。更に、表面修飾に起因する分解速度の制御や、修飾 PLA と酸化 PHBH を相溶化剤とした材料の複合化による PHA の強度向上を達成する。これにより、医療用プラスチックや電子材料としての用途拡大を実現する。

【実験】PHBH フィルムは、175°Cで 10 分間、熱圧縮することで作製した。同様に PLA フィルムを作製した。得られたフィルムを ClO₂ ラジカル存在下、光照射 (LED ランプ: λ=365 nm) することで酸化処理した。酸化 PHBH および PLA フィルムは、静的な水接触角測定により表面濡れを、NMR 測定、XPS 測定により導入官能基組成および量を評価した。

【結果と考察】酸化 PHBH 表面の静的な水接触角測定結果を Fig. 1 に示す。酸化時間の延長に伴い接触角が低下し、最小で 55°となったことから、本反応により表面が親水性化することが明らかとなった。また、XPS 測定から、PHBH 表面の酸素原子/炭素原子比 (O/C ratio) が増加することがわかった (Fig. 1)。このことから、本酸化処理により PHBH 表面に酸素が導入され、それに伴い親水性が向上することが示唆された。また、¹H NMR 測定から PHBH の側鎖に対応するピークの減少が認められ、側鎖の C-H が優先的に酸化されていることが推察された。酸化 PHBH フィルムに対してカチオン性のトリイジンブルーによる染色実験を行ったところ、未処理の PHBH に対して有意に染色できた。このことから、酸化処理した PHBH にアミノ基などのカチオン性官能基をもつ医薬品を担持させるなど、機能性生分解性フィルムなどへの応用も期待される。同様の酸化処理を PLA に対して行った結果および酸化ポリエステルを用いた複合材料の各種物性を検討した結果についても併せて発表する。

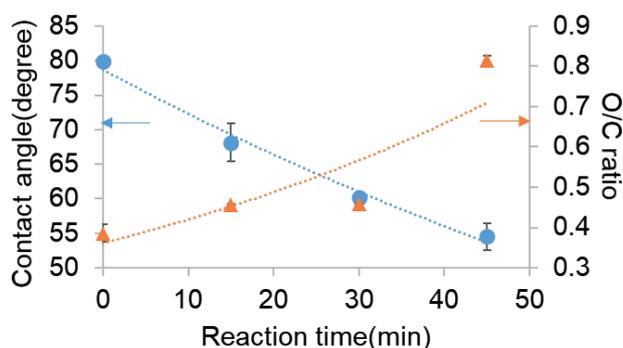


Figure 1. Contact angle and O/C ratio of PHBH surface as a function of reaction time.

Functionalization of biodegradable polyester by surface oxidation

Weiting Wu¹, Haruyasu Asahara¹, K. Sudesh Kumar², Taka-Aki Asoh¹, Hiroshi Uyama¹¹Graduate School of Engineering, Osaka University² Universiti Sains Malaysia

Tel: +81-6-6879-7364, Fax: +81-6-6879-7367, E-mail: w_wu@chem.eng.osaka-u.ac.jp

生体模倣ポリマーブラシの自律的構造転移に向けた原子間力顕微鏡による修飾密度の検討

¹東京大学大学院工学系研究科, ²お茶の水女子大学人間文化創成科学研究科
○本間 健太¹, 太田 裕治², 秋元 文¹, 吉田 亮¹

【緒言】刺激応答性高分子を材料表面に修飾した機能性ソフト界面は、温度や光などの外部刺激によって簡単に材料の界面物性を制御することが可能である。一方で、我々は温度応答性高分子 *N*-isopropylacrylamide(NIPAAm)と Belousov-Zhabtinsky(BZ)反応の金属触媒 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ からなる自励振動高分子^[1]を基板表面に修飾することで自律的に機能を発現する自励振動ポリマーブラシを開発してきた^[2,3]。BZ 反応中、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ が周期的に価数変化することで基板上の高分子鎖の自律的なコンフォメーション変化が誘起される。さらに、BZ 反応基質の拡散に伴い高分子鎖の伸展した領域が基板表面を伝播する。生体内の繊毛運動に類似したこの現象を利用することで、新規物質輸送や流体制御デバイスへの展開が期待される。本研究では高分子鎖の自律的な構造転移に向けて、表面のナノ構造観察などに広く用いられる原子間力顕微鏡(AFM)を活用し、平衡/非平衡状態において修飾密度がこのソフト界面のコンフォメーション(膜厚)に与える影響について考察する。

【実験】シランカップリング反応によりガラス基板に原始移動ラジカル重合(ATRP)開始剤 2-(*m/p*-chloromethylphenyl)ethyltrimethoxysilane(CIMPETMS) および ATRP 非開始剤 phenethyltrimethoxysilane(PETMS)を異なる比率(CIMPETMS/PETMS = 100/0, 50/50, 10/90, $v/v\%$)で共固定した。表面開始型 ATRP により NIPAAm、*N*-3-aminopropyl(methacrylamide)(NAPMAm)を共重合することでガラス基板に poly(NIPAAm-*r*-NAPMAm)を修飾した。最終的にスクシンイミジル基を有する $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を NAPMAm のアミノ基と反応させることで、異なる修飾密度の自励振動高分子修飾表面を調製した。修飾高分子を部分的に除去し、AFM で断面をスキャンすることで高分子層の膜厚を測定した。また、基板をそれぞれ Ru^{2+} 、 Ru^{3+} 固定溶液に浸漬し、膜厚膨潤度の温度依存性を調べた。

【結果と考察】調製した3種類の自励振動高分子修飾基板(INI-x:x は CIMPETMS の比率)において、一部高分子を除去した際の断面図を AFM により得た(Fig. 1 a)。開始剤導入比率の増加に伴い、高分子層の膜厚も増加した。隣接する高分子鎖同士の立体障害が増すことで、より伸展した構造になったためと考えられる。

さらに、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ を還元または酸化状態に固定し、各温度で膨潤度を測定した。Fig. 1 b)に INI-100 の結果を示す。いずれの基板においても、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ が酸化状態の時は温度上昇に応じて膜厚が減少した。一方、還元状態では測定した温度領域全てにおいて膨潤度は酸化状態のそれ以下であった。酸化/還元状態間で異なる膨潤度を示す温度領域において BZ 反応を生起することで、動的な膜厚振動が期待される。発表当日は、修飾密度が動的な高分子鎖のキネティクスなどにどのように影響するか議論する。

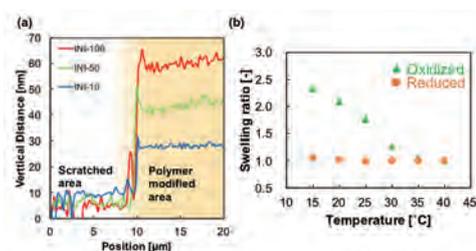


Fig. 1 a) Cross-sectional view of each surface in air obtained by AFM. b) A representative graph of the temperature dependence of swelling ratio (INI-100). $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ was equilibrated at reduced (Ru^{2+}) and oxidized (Ru^{3+}) states.

【参考文献】 [1] R. Yoshida *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5134. [2] T. Masuda *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7468. [3] T. Masuda *et al.*, *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 7395.

Toward Autonomous Conformational Transition on a Biomimetic Polymer Brush Surface: Investigation of the Effect of Grafting Density by Atomic Force Microscopy

Kenta Homma¹, Yuji Ohta², Aya Mizutani Akimoto¹, Ryo Yoshida¹

¹School of Engineering, The University of Tokyo ²School of Humanities and Science, Ochanomizu University

Tel: +81-3-5841-7112, Fax: +81-3-5841-7112, E-mail: homma@cross.t.u-tokyo.ac.jp

表面カルボキシ化ナノセルロースを用いたECM模倣基板上での線維芽細胞の培養

九州大学大学院農学研究院環境農学部門
○畠山 真由美, 一瀬 博文, 北岡 卓也

【緒言】細胞外マトリックス (ECM) は、単に細胞と細胞の間を埋める充填物ではなく、細胞の分化や増殖に直接影響する重要な生命機能を持つ。そのため、細胞の生体外組織培養への応用に向けて、ECMを模倣した培養基板の開発が盛んに行われている。本研究では、セルロースナノファイバー (CN) を用いることで、ECMの主要成分であるコラーゲンのナノファイバー形状を物理的に模倣した。さらに、CNの結晶表面を2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxy (TEMPO) の触媒酸化によりカルボキシ基を規則的に導入することで、同じくECMであるヒアルロン酸のウロン酸型繰り返し構造の模倣を試みた。物理的・化学的にECMを模倣したTEMPO酸化セルロースナノファイバー (TOCN) を用いて細胞培養基板を調製し、マウス由来線維芽細胞 NIH/3T3 の培養を試みた。

【実験】物理解繊CNのTEMPO酸化は既報に従って行い、次亜塩素酸ナトリウムの添加量でカルボキシ基の導入量を制御した。各TOCN水分散液 (0.5 wt%) を200 μ Lずつカバーガラスに塗布し、室温で24 h乾燥させたものを基板として細胞培養試験に供した。細胞培養試験は、滅菌した細胞培養基板を設置した24-wellプレートにNIH/3T3細胞を50,000 cells/wellとなるように播種し、72 h培養することで細胞接着性を評価した。培養後のNIH/3T3細胞はカルセインAMで生細胞を緑色、エチジウムホモダイマーIIIで死細胞を赤色に同時染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

【結果と考察】含有カルボキシ基量が異なるTOCN基板上でNIH/3T3細胞を72 h培養した結果、カルボキシ基を持たないCN基板およびカルボキシ基量が0.39 mmol/gのTOCN基板では、細胞がスフェロイドを形成し、基板上に弱く接着した (Fig. 1a, 1b)。カルボキシ基量が0.59-0.94 mmol/gのTOCN基板では、細胞接着に不利な親水性表面であるにもかかわらず、細胞が基板に接着・伸展しており、基板のカルボキシ基量が多いほど、接着生細胞数が増加した (Fig. 1c, 1d, 1e)。しかし、カルボキシ基量が1.60 mmol/gの基板では細胞が伸展せず、再びスフェロイドを形成した。一般的に播種した培養細胞が基板に接着するためには、まず始めに培地中の血清に含まれるフィブロネクチンやビトロネクチン等の接着性タンパク質が基板に吸着する必要がある。そのため、細胞培養には接着性タンパク質の吸着に適した疎水性基板が用いられるが、本結果から、セルロースナノファイバー界面の親水性のカルボキシ基が細胞接着に直接的な影響を与える可能性と、最適なカルボキシ基量の存在が示唆された。また、NaOHを用いたマーセル化処理で得られる結晶構造の異なるTOCNを用いると、処理前では細胞が接着可能なカルボキシ基量であっても細胞がスフェロイドを形成したことから、物理的因子であるセルロースの結晶形も細胞接着に影響を及ぼす可能性が考えられる。

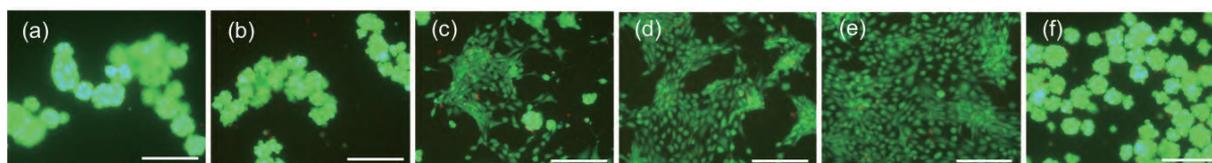


Figure 1 Fluorescence images of NIH/3T3 cells after 72-h incubation on a variety of TOCN substrates with different carboxylate contents: (a) COOH-free CN, (b) TOCN (0.39 mmol/g), (c) TOCN (0.59 mmol/g), (d) TOCN (0.84 mmol/g), (e) TOCN (0.94 mmol/g), and (f) TOCN (1.60 mmol/g). Scale bars: 200 μ m.

Fibroblast cell culture on ECM-mimetic substrates prepared using surface-carboxylated nanocellulose

Mayumi Hatakeyama, Hirofumi Ichinose, Takuya Kitaoka

Department of Agro-Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University

Tel: +81-92-802-4665, Fax: +81-92-802-4665, E-mail: tkitaoka@agr.kyushu-u.ac.jp

銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルムの抗バイオフィーム活性

¹熊本大学大学院先端科学研究部, ²ヤンゴン工科大学化学工学専攻, ³熊本大学大学院生命科学研究部, ⁴大日本塗料株式会社,

○本山 奈菜¹, Kaung Kyaw^{1,2}, 市丸 裕晃¹, 原田 彩花¹, 小野 勝彦³, 津々木 博康³, 澤智裕³, 宮澤 雄太⁴, 溝口 大剛⁴, 新留 琢郎¹

【緒言】バイオフィームによる感染症は体内での微生物感染症の80%以上を占めると言われており、浮遊している細菌と比較して1000倍以上の抗菌薬に対する耐性を持っている¹⁾。バイオフィームによる感染症の多くは医療機器関連感染症に関連しており、大きな問題となっている²⁾。一方、銀および銀イオンとその誘導体は、優れた抗菌活性を持ち、薬剤耐性菌に対しても抗菌活性を持つことが古くから知られている。これらのことから、医療機器の表面に銀ナノ粒子をコーティングすることによってバイオフィームによる感染症の防止が期待できる。そこで本研究では三角形プレート状銀ナノ粒子を含有させた薄層ポリマーフィルムを作製し、抗バイオフィーム活性の評価を行った。

【実験】銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルムは、生分解性ポリマー(ポリカプロラクトン(PCL)、ポリ-L-乳酸カプロラクトン共重合体(PLCL)、ポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA))を酢酸エチルに溶解させた溶液と有機溶媒分散銀ナノプレート(大日本塗料株式会社)を混合し、ガラスプレート上にスピコートすることによって作製した。抗バイオフィーム活性は、銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルム上に形成した黄色ブドウ球菌のバイオフィームをクリスタルバイオレットによって染色し、595nmの吸光度を測定することによって評価した。

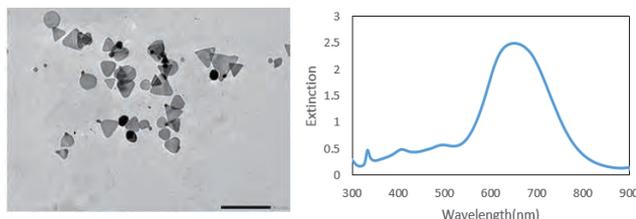


Fig.1 三角形プレート状銀ナノ粒子のTEM画像と吸収特性

【結果と考察】作製したポリマーフィルムの抗バイオフィーム活性を評価した結果、PCL、PLCL、PLGA共に、銀に対するポリマーの量が少ないほど高い抗バイオフィーム活性が生じることが分かった(Fig.2)。これはポリマー表面に存在する銀ナノプレートがバイオフィームの形成を阻害しているためであると考えられる。以上の結果より、本研究で作製した銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルムは生体内でバイオフィームの形成を阻害する生体材料として応用が有効であるという可能性を見出した。

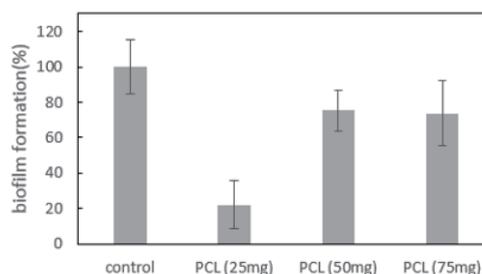


Fig.2 銀ナノ粒子に対するPCLの量を変化させたときの抗バイオフィーム活性

【参考文献】

1) Davies, D.; Nat. Rev. Drug Discov. 2003, 2, 114-122.

2) Ashutosh, K.; Anwar, A.; Mamta, R.; Nasreen, Z. E.; Seyed, E. H.; Int. J. Med. Microbiol. 2017, 307, 481-489.

Anti-biofilm activity of silver nanoparticle-containing thin layer polymer film

Nana Motoyama¹, Kaung Kyaw^{1,2}, Haroaki Ichimaru¹, Ayaka Harada¹, Katsuhiko Ono³, Hiroyasu Tsutsuki³, Tomohiro Sawa³, Yuta Miyazawa⁴, Daigou Mizoguchi⁴ and Takuro Niidome¹

¹ Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University

² Department of Chemical Engineering, Yangon Technological University

³ Department of Microbiology, Graduate School of Medical Science, Kumamoto University

⁴ Dai Nippon Toryo Co., Ltd.

Tel: 096-342-3667, Fax: 096-342-3668, E-mail: niidome@kumamoto-u.ac.jp

表面親水性を制御した Ti へのタンパク質模擬物質吸着挙動

¹名古屋大学大学院工学研究科, ²名古屋大学未来材料・システム研究所
 ○森 祐輔¹, 黒田 健介², 興戸 正純²

【緒言】生体内に埋植した骨代替材料表面に硬組織が形成する際には、まず表面にタンパク質が吸着し、そのタンパク質を介して、骨の形成に必要な骨芽細胞（様細胞）が接着すると考えられている。しかし、著者らはこれまでに、あらかじめインプラント表面に細胞接着性・非接着性タンパク質を吸着させても、その吸着量が体内埋植後、骨伝導性に影響を及ぼさないことを明らかにしてきた。本研究では、インプラントに吸着するタンパク質の挙動に注目し、ポリペプチドや界面活性剤などのタンパク質を模擬した物質のインプラントへの吸着挙動ならびに模擬物質を事前吸着させた表面へのタンパク質の吸着挙動を調査することにより、タンパク質中のアミノ酸の種類やタンパク質の吸着速度の骨形成に影響をおよぼす因子を明らかにすることを最終目的とした。

【実験】湿式鏡面研磨（表面粗さ $Ra/\mu\text{m} < 0.1$ ）した Ti($\phi 8$ mm)平板及び Au 電極($\phi 3$ mm)に、180 °C の蒸留水に 3 h 浸漬する水熱処理もしくは大気圧プラズマ照射(1 min.)を施した後、室温または 240 °C の大気中に最長 7 d 保持し、水滴接触角(WCA)を制御した。試料表面にタンパク質模擬物質（パラトルモン(分子量約 10000)、リボヌクレアーゼ(13000)、リゾチーム(14000)、ミオグロビン(17000)、トリプシン(23000)、エラスターゼ(25000) およびタンパク質（アルブミン(66000)、カタラーゼ(240000)、フィブロネクチン(440000)）の水溶液(40 μL)を滴下後、37 °C で最長 3 d 保存し吸着させた。さらにタンパク質模擬物質を吸着させた試料表面へアルブミンを吸着させた。各物質の試料表面への初期吸着速度を QCM による周波数変化から評価した。また、試料表面の状態を XPS, FT-IR, WCA 測定 (2 μL) により評価した。タンパク質模擬物質を吸着させた試料をラット脛骨骨幹部に埋植し (14 d)、骨伝導能 R_{B-I} (硬組織が生成している部分の合計長さ $\times 100$ / 試料の長さ) を求めた。

【結果と考察】試料表面へのタンパク質および模擬物質の初期吸着速度は物質の分子量によって傾向が異なった。分子量の大きいカタラーゼとフィブロネクチンの吸着速度は溶液中での拡散抵抗の影響を受け、試料表面の WCA に影響を受けず、著しく吸着速度が遅いことが分かった。一方、分子量の小さいタンパク質であるアルブミンや模擬物質の吸着速度は試料表面の WCA に強く影響を受けた。分子量の小さい物質は、含まれる親水基が多いほど親水性表面での吸着速度が増加し、疎水基が多い物質ほど疎水性表面での吸着速度が増加した。このことから、物質末端の親水基と疎水基ではなく、物質中のアミノ酸に含有される親水基、疎水基が吸着速度に影響するものと考えられる。また、あらかじめ模擬物質を吸着させた試料へのアルブミンの吸着速度は、WCA が同一の未吸着試料へのアルブミン吸着速度と同程度であった。また、模擬物質吸着試料にアルブミンが吸着する際には、事前吸着した模擬物質は脱離しなかった。また、アルブミンの吸着速度は、事前吸着した模擬物質の量と種類によらず、表面の WCA に依存した。このことから、タンパク質が吸着する際には、表面に存在している物質ではなく、表面の WCA に影響する因子に強く影響を受けていると考えられる。当日は模擬物質吸着試料の骨伝導性についても報告する予定である。

Protein Alternative Substance Adsorption of WCA-controlled Titanium

Yusuke Mori¹, Kensuke Kuroda², Masazumi Okido²

¹ Department of Materials Process Engineering, Nagoya University

² Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University

Tel: +81-52-789-3230, Fax: +81-52-789-3355, E-mail: mori.yusuke@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

ナノアパタイトが心筋細胞へのトランスフェクションに与える細胞内取り込みの解明

¹ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, ² 東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ³ 愛知学院大学歯学部

○小室 博明¹, 笹野 哲郎¹, 山下 仁大², 永井 亜希子³

【緒言】

ナノ粒子は細胞内へ遺伝物質を運ぶためのベクターとして応用されている。遺伝子デリバリーの最終的な目標は、遺伝子を細胞内に効果的に導入させ、副作用のない遺伝子ベクターの開発である。リン酸カルシウム的一种であるヒドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) は優れた生体適合性や核酸を安定化させることができるためにベクターとして用いた。低いトランスフェクション効率を改善するために、細胞特異的なエンドサイトーシス経路に着目した。我々の以前の報告では内皮細胞はカベオラ依存のエンドサイトーシスであることを示した。本報告では、心筋細胞によるナノアパタイトのエンドサイトーシス経路を調べた。

【実験】

ナノアパタイトは W/O エマルジョン法で作製した。作製した試料のキャラクタリゼーションは透過型電子顕微鏡(TEM)、X線回折装置(XRD)、およびフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)を用いて評価した。マウス心房心筋由来株化細胞の HL-1 細胞にナノアパタイトを接触させた後、細胞毒性は MTT assay にて評価した。また、HL-1 細胞によるナノアパタイトのトランスフェクション効率はプラスミド GFP を用いて蛍光顕微鏡観察で評価した。さらに、HL-1 細胞の細胞内取り込み経路に対する特異的な阻害剤とマーカーを用いて同様に評価し、主要なエンドサイトーシス経路を評価した。

【結果と考察】

TEM からナノアパタイトは直径約 30 nm の球状形態を示した。XRD の回折ピークは HAp と一致した。FT-IR スペクトルも HAp に存在するイオンを確認した。HL-1 細胞の細胞毒性は用いた濃度範囲内では生じなかった。トランスフェクション効率は以前報告した他の細胞よりも高い値を示した。HL-1 細胞によるナノアパタイトの主要な細胞内取り込み経路はマクロピノサイトーシスであることが分かった (Figure 1)。さらにマクロピノサイトーシスマーカーの細胞内の取り込みも観察された。マクロピノソームは他のエンドソームよりも漏れやすいベジクルであるといわれる。それゆえ、トランスフェクション効率は HL-1 細胞のリソソーム内で分解されないために高い値を示すことが示唆された。この結果は、心筋細胞におけるナノアパタイトベースの遺伝子デリバリー開発のための鍵となると期待される。

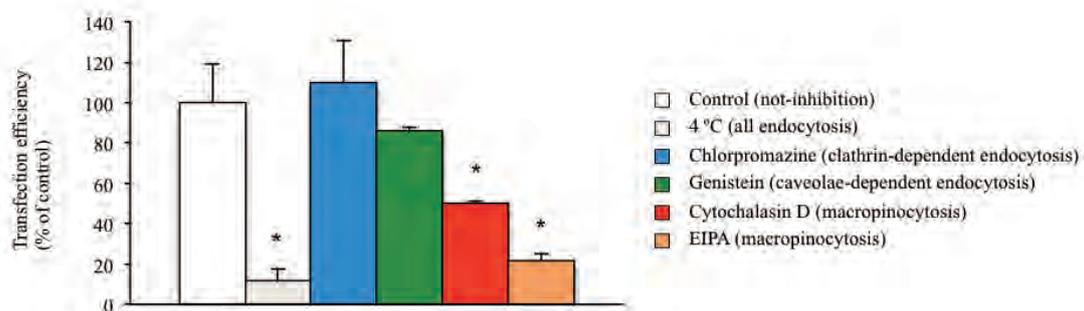


Figure 1. Endocytosis pathway of HAp in the presence of various endocytosis inhibitors in HL-1 cells, respectively (n=4, * : $p < 0.05$ vs control).

Elucidation of intracellular uptake for transfection of cardiomyocytes with nanoapatite

Hiroaki Komuro^{1,*}, Tetsuo Sasano², Kimihiro Yamashita³, Akiko Nagai⁴.

¹ Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

² Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

³ School of Dentistry, Aichi Gakuin University

*E-mail. hkomuro.cvp@tmd.ac.jp

表面処理による多孔質チタンの生体活性に関する研究

大分工業高等専門学校機械工学科
○坂本 裕紀

【緒言】

チタンは軽量で耐腐食性に優れ生体親和性も高いため、歯科インプラントなどの生体材料として用いられるが、骨と直接結合しないことが問題となっている。その解決方法として生体適合性の優れたアパタイトを被覆させる方法とチタンを多孔質化する方法がある。化学的に生体適合性を高める方法として、アルカリ加熱処理やアパタイト核処理がある。本研究では、アパタイト核処理に注目し、多孔質チタンの表面観察及び表面積の影響を調べることで、多孔質チタンの生体活性に対してどれほどの影響を及ぼすか検討した。

【実験】

試料は放電プラズマ焼結法(SPS)によって製作した多孔質チタンの丸棒を使用した。粒度 100 μm ～125 μm の球状純チタン粉末をパルス通電焼結装置により焼結されたものであり、気孔率は約 34% である。本研究では生体内を再現した疑似体液を作製し多孔質チタンのアパタイト析出を確認した。チタンの表面にはアパタイト形成を誘起させる化学処理として、アパタイト核処理を施した。浸漬期間は 1 週間とし体温を想定して 36.5 $^{\circ}\text{C}$ に保ったインキュベータ内に保持した。なお、pH やイオン濃度の変化を防ぐため、3 日おきに SBF を交換した。3 日間おきに SEM を用いて試料の表面観察をし、結晶粒の形状、析出物の確認を行い、アルカリ加熱処理との比較も行った。

【結果と考察】

表面観察の結果、アパタイト核処理の前処理である硫酸への浸漬により試料の表面に無数の凹凸が確認できた。これにより、非処理の試料に比べ表面積が大きくなり、アパタイトの析出量が多くなると考えられる。アパタイト核処理を施した試料に析出物を確認することができた。また、非処理や硫酸処理のみを行った段階ではアパタイトは確認できなかった。アルカリ加熱処理を施して 1 週間浸漬を行った試料に比べ、アパタイト核処理では 3 日間でチタン粒子表面に十分な量の析出物を確認することが出来た。これにより *in vivo* 実験を行った際に骨との早期結合、生体活性の向上が期待される。多孔質チタンの表面積とアパタイト析出量との関係を理論的に評価した結果、粒子間の接合面積を考慮しない場合、多孔体の緻密体に対する比表面積 C 、粒子 1 個の表面積 p 、多孔体中の粒子の数 N 、見掛けの表面積 S とすると、チタン粉末の粒度と表面積との関係は以下のようになる。

$$C = \frac{p \cdot N}{S}$$

多孔質チタンに用いるチタン粉末の粒子直径が小さくなればなるほど、理論的な表面積が増加していることが分かった。加えて、アパタイト核処理における硫酸への浸漬により表面が更に凹凸となり、表面積が急激に増加していると考えられる。チタンの表面修飾はその表面酸化被膜に依存する、そのためアルカリ加熱処理を施した試料より、SBF 浸漬におけるアパタイトの析出が促進されたと考えられる。

Study on bioactivity of porous titanium by surface treatment

Yuki Sakamoto

¹National Institute of Technology, Oita College

Tel: +81-97-552-6879, Fax: +81-97-552-6975, E-mail: ysak@oita-ct.ac.jp

医療用架橋 PTFE の耐放射性特性に関する分子レベル解析

¹滋慶医療科学大学院大, ²大阪府大工, ³阪大工
○齋藤寛¹, 古田雅一², 松垣あいら³, 中野貴由³, 大石雅子¹, 岡崎正之^{1,3}

【緒言】

ポリテトラフルオロエチレン PTFE(polytetrafluoroethylene)は、人工血管や縫合糸のような医療材料素材として欠かせない。最近、医療材料の滅菌方法として Co-60 放射線照射は密封した状態で照射可能なことから広く普及しているが、 γ 線照射された PTFE は、引張強度が低下するとの報告があるものの、放射線滅菌による物性への影響に関しては、未だ十分な検討がなされていないのが現状である。特に今回用いる架橋 PTFE は、予め化学的架橋された新規材料で、耐放射性特性については十分に検証されていない。本研究では、医療機器材料安全管理学の観点から Co-60 放射線照射後の架橋 PTFE の物性変化について物理学的、化学的に検証することにした。

【実験】

日立金属株式会社製部分架橋 PTFE (XF1B) および全架橋 PTFE (XF2) を用いた。PTFE のダンベル型 7 号形状 (JIS K 6251) 試料片 (試験部断面積: $2\text{ mm} \times 0.5\text{ mm} = 1.0\text{ mm}^2$ (XF1B); $2\text{ mm} \times 0.4\text{ mm} = 0.8\text{ mm}^2$ (XF2)) を作製し、各試料 (N = 5) を 0 - 100 kGy にて Co-60 γ 線照射し引張試験に供した。放射線照射は、大阪府立大学放射線研究センターにて行った。引張試験機としては、株式会社イマダ製デジタルゲージ ZTS-500N、電動スタンド MX2-500N、及びチャック FC-20 上下 2 個を用いて計測した。クロスヘッド引張速度は 50 mm/min 一定とした。

化学分析用試料として同じく日立金属株式会社製 PTFE 板状試料 ($15\text{ mm} \times 15\text{ mm} \times 0.5\text{ mm}$ (XF1B); $15\text{ mm} \times 15\text{ mm} \times 0.4\text{ mm}$ (XF2)) を用いた。この板状試料を大阪府立大学放射線研究センターにて Co-60 γ 線照射することにより、X 線回折及び Raman 分析に供した。

【結果と考察】

部分架橋 PTFE においては、1kGy の放射線量を照射した後の試料から引張破断強度に低下が認められ、50kGy の放射線照射では引張試験前にすでに 2 本の試料が破壊され、100kGy では 5 本すべての試料が破壊されていた。一方、全架橋 PTFE においては、50kGy 以上の放射線量を照射した後の試料において、ようやく引張破断強度に低下が認められた。

X 線回折の結果、部分架橋 PTFE において、回折線ピーク強度は放射線照射により増加する傾向が認められたが、全架橋 PTFE では、放射線照射による回折線ピークの増加は確認できなかった。これらの結果から、部分架橋 PTFE では、放射線照射に伴い結晶化が進んだが、全架橋 PTFE では、架橋により結晶構造の変化が少なかったことが考えられる。

ラマン分析の結果では、部分架橋 PTFE の場合、放射線照射量が大きくなるほど、各散乱スペクトルの強度は大きくなったが、全架橋 PTFE では、散乱スペクトルの強度にほとんど変化はみられなかった。これらの結果から、部分架橋 PTFE の高分子鎖では、放射線照射により低分子に分解されたことが示唆された。

今回使用した架橋 PTFE は、特に全架橋 PTFE の場合に、放射線照射による劣化がかなり抑制されたことが考えられる。非架橋 PTFE を材料として使用している従来の医療器具に比べ、全架橋 PTFE は、放射線滅菌による材質の劣化が抑制されることから、医療機器材料への応用が期待される。

Molecular Level Analysis of Radiation-resistant Properties of Cross-linking PTFE for Medical Use
Hiroshi Saito¹, Masakazu Furuta², Aira Matsugaki³, Takayoshi Nakano³, Masako Oishi¹, Masayuki Okazaki^{1,3}

¹Graduate School of Health Care Sciences, Jikei Institute

²Department of Quantum and Radiation Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University

³Division of Materials & Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University

Tel: +81-6-6150-1336, Fax: +81-6-6150-1337, E-mail: h-saito@ocmt.ac.jp

ラベル貼着剤に含まれる可塑剤成分の PVC 製バッグ保存血液への移行

¹ 国立医薬品食品衛生研究所, ² 日本医療研究開発機構

○野村祐介¹, 河上強志¹, 福井千恵¹, 森下裕貴^{1,2}, 岡本吉弘¹, 藪島由二¹

【諸元】フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) はポリ塩化ビニル (PVC) 製医療機器の代表的可塑剤であるが、生殖毒性等の観点から各国において規制が強化され、代替可塑剤又は非 PVC 製品の使用が推奨されている。近年、我々が実施した新規血液バッグの開発を目指した PVC 製血液バッグのフィジビリティ試験において、血液バッグの材料成分に含まれないフタル酸ジシクロヘキシル (DCHP) が保存血液から検出された。2018 年より DCHP は欧米及び欧州において DEHP 同様に規制対象物質となっているため、本研究では、血液バッグの安全性向上を目的として、DCHP の混入原因を解明すると共に、保存血液中の DCHP 濃度推移について検討した。

【実験】ウシ新鮮血から血漿及び SAGM 加赤血球濃厚液 (SAGM/RCC) を調製後、ラベル無し、ラベル有り血液バッグ及びガラスバイアルを用いて、4°C で保存した。陰性対照には、SAGM 溶液を用いた。各試料を保存した血液バッグ及びガラスバイアルを緩やかに振とうし、保存血液を良く混和した後、サンプリングポートを介して、保存開始後 1 日目及び 1-6 週目に各バッグから大気非接触下に採取した。各試料 50 µL を正確にスクリーキャップ付きガラス試験管に採取し、1% NaCl 溶液 (1 mL)、ヘキササン (2 mL) 及び内部標準物質を添加後、10 分間激しく振とうした。遠心分離により得られた上清 (ヘキササン層) を無水硫酸ナトリウムにより脱水した後、常法に従って GC-MS/MS 分析に供して可塑剤溶出量を測定した。また、DEHP-PVC 製血液バッグの各部位から有機溶媒抽出を行い、同様に可塑剤の分析を行った。

【結果及び考察】DCHP は血液バッグ本体及び付属チューブからは検出されず、ラベル貼着部分からのみ検出された。DEHP はラベルの有無にかかわらず、血液バッグに保存したウシ血漿及び SAGM/RCC から同程度検出された。一方、ラベル無し血液バッグに保存したウシ血漿及び SAGM/RCC からは DCHP は検出されず、ラベル有り血液バッグからは経過的に DCHP が溶出していることが判明した。また、陰性対照である SAGM 溶液群及びガラスバイアル保存群からは DEHP 及び DCHP 共に検出されなかった。これらの成績から、血液バッグ用ラベル貼着には DCHP を主成分とした感熱性接着剤が使用されており、加熱貼着時に DCHP が PVC 製血液バッグ素材に移行し、その後、保存血液に溶出していることが示唆された。DCHP は欧米及び欧州において規制対象となっているため、当該可塑剤を含有する感熱性接着剤の PVC 製血液バッグへの使用については、注意が必要であると考えられる。

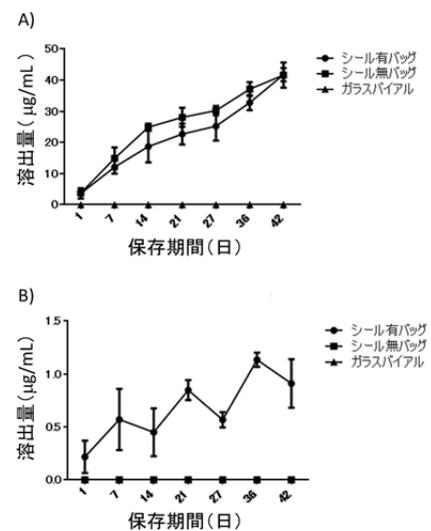


図 1. ウシ SAGM/RCC 中の可塑剤濃度推移. A) DEHP, B) DCHP

Migration of label adhesive plasticizer to blood preserved in PVC bag.

Yusuke Nomura¹, Tsuyoshi Kawakami¹, Chie Fukui¹, Yuki Morishita^{1,2}, Yoshihiro Okamoto¹, Yuji Haishima¹

¹ National Institute of Health Sciences, ² Japan Agency for Medical Research and Development

Tel: +81-44-270-6540, Fax: +81-44-270-6611, E-mail: haishima@nihs.go.jp

温度応答型カチオン性くし型共重合体/ペプチド複合体による脂質膜形態の操作

東京工業大学 生命理工学院

○増田 造, 落合 拓郎, 嶋田 直彦, 丸山 厚

【緒言】 生体膜透過ペプチド E5 は中性条件ではランダムコイルであり膜破壊能を持たないが、酸性条件において両親媒性の α -ヘリックスを形成し膜破壊能を発現する^{1,2}。当研究室では、カチオン性くし型共重合体 poly(allylamine)-graft-dextran (PAA-g-Dex) が、静電相互作用により E5 ペプチドと可溶性複合体を形成し、中性条件においても α -ヘリックスの形成と膜破壊能を誘起することを見出した³。さらに、E5/PAA-g-Dex 複合体を細胞程度の大きさの脂質小胞であるジャイアントリポソームに添加すると、脂質膜のシート形状への構造転移が観察された⁴。このような脂質膜のシート・ベシクル転移を外部刺激により操作できれば、新しい生体材料への展開につながると考えられる。E5/PAA-g-Dex 複合体が脂質エッジの親・疎水界面を安定化することにより脂質シートが形成されたと考えられる。そこで本研究では、PAA に側鎖として dextran および親・疎水転移を示す温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) を導入した混合グラフト共重合体(PAND) (Fig. 1)を設計し、E5/PAND 複合体による脂質シート形成とその温度変化による操作を試みた。

【実験方法】 温度応答型カチオン性くし型共重合体 PAA-g-PNIPAAm は既報⁵に従って調製した。さらに還元的アミノ化により dextran を導入することで目的の PAND を得た。調製した共重合体は GPC-MALS, ¹H NMR により評価した。蛍光標識したリポソーム(99.6 mol% DOPC, 0.2 mol% PEG2k-DSPE, 0.2 mol% rhodamine labeled-DOPE)に E5 および PAND を添加し、共焦点蛍光顕微鏡観察により脂質膜の形態を評価した。

【結果と考察】 調製した共重合体の数平均分子量は 9.0×10^4 であり、PNIPAAm, dextran の導入率はそれぞれ 6.2 mol%, 4.5 mol%であった。PNIPAAm の下限臨界溶液温度(LCST)以下においてリポソーム分散液に E5 および共重合体を添加したところ(終濃度: 0.5 mM lipid, 10 μ M E5, 600 μ M polymer)、各共重合体で脂質シート形成が観察された。E5/PAND 複合体は脂質膜エッジの水・油界面のエネルギーを十分低下させたことでシートが形成されたと考えられる。さらに、形成された脂質シートを LCST 以上である 35 $^{\circ}$ C で 10 分インキュベートしたところ、混合グラフト共重合体では脂質膜のベシクル形状への復帰が見られた (Fig. 2)。すなわち、温度応答性/親水性側鎖の導入率が脂質膜のシート・ベシクル形状制御において重要であることが示唆された。当日はグラフト鎖の導入率が E5 との複合体形成や脂質膜形態制御に及ぼす影響についても報告する予定である。

1) M. Murata, et al., Ohnishi, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 14353. 2) M. Murata, et al., *Biophys. J.* 1993, 64, 724. 3) N. Shimada et al., *J. Controlled Release* **2015**, 218, 45. 4) N. Shimada et al., in preparation. 5) T. Masuda et al., *Biomacromolecules* **2018**, 19, 1333.

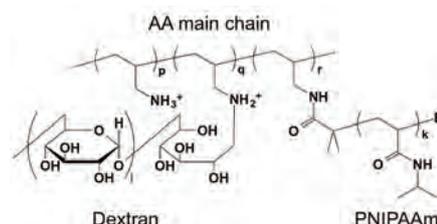
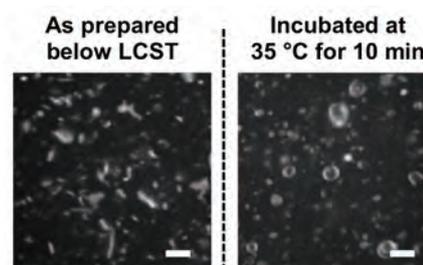


Fig. 1 Chemical structure of the hetero grafted cationic copolymer, PAND.



Fluorescence images of lipid membranes in the presence of PAND. Scale: 5 μ m.

Control of sheet-vesicle morphology changes of a lipid membrane by thermo responsive cationic comb-type copolymer/peptide complex

Tsukuru Masuda, Takuro Ochiai, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 4259 B-57 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan 226-8501)
Tel: +81-45-924-5762, E-mail: amaruyama@bio.titech.ac.jp

フッ素含有高分子の界面水和構造とタンパク質吸着挙動

¹九州大学 先端物質化学研究所 ソフトマテリアル学際化学分野, ²AGC 株式会社商品開発研究所, ³Department of Energy Conversion and Storage, Technical University of Denmark
 ○小口 亮平^{1,2}, Jankova Atanasova Katja³, 山本 今日子², 田中 賢¹

【緒言】細胞・タンパク質などの生体分子と高分子表面は水分子を介して接触するため、高分子表面の水和構造は、医療機器の開発において重要な指針となる。ポリ(2-メトキシエチルメタクリレート)(PMEA)は、高分子鎖と中間水的な相互作用を示し分子運動性が比較的高い「中間水」を有し、優れた血液適合性を示すことが知られている¹⁾。また2 mol%のアミノ基が共重合された(2-ヒドロキシメタクリレート)(HEMA)や、2-7 mol%のフッ素モノマーが共重合されたHEMAはホモポリマー(PHEMA)と比較して、リンパ球およびタンパク質の吸着がそれぞれ抑制される²⁾との報告がなされている²⁾。本報告では、原子移動ラジカル重合(ATRP)を用いて、フッ素元素が共重合されたPMEAを合成し、少量の異種元素が水和構造に与える影響の考察とともに生体応答性の評価を行った。

【実験】分子運動性に着目し、2種類のフッ素含有PMEAの合成を行った。2,2,2-トリフルオロエチルメタクリレート(3FM)を低分子量で重合したマクロモノマーおよびエステル化された2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-ペンタデカフルオロ-1-オクタノールを開始剤としてMEAを重合し、P3FM-*b*-PMEA、F15-*b*-PMEAをそれぞれ得た(Fig. 1)。得られた高分子を純水に十分含浸させDSC測定をすることでバルクの水和構造を調べた。また、高分子をスピコーティングした膜の接触角測定、AFM測定により高分子/水界面構造をそれぞれ評価した。さらに、フィブリノーゲンと血小板の粘着試験を行うことで、生体応答性を評価した。

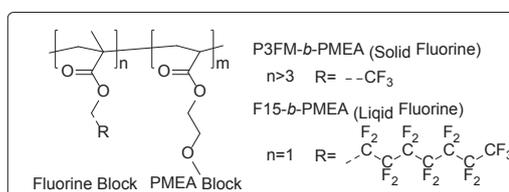


Fig. 1 Chemical structure of fluorinated PMEA

【結果と考察】得られた高分子は、約2 wt%以上の中間水を有するが、フィブリノーゲンの吸着量に大きな差が認められた。各高分子膜をPBSで浸漬させることでフィブリノーゲンの吸着が相対的に抑制されることも確認され、特にP3FM-*b*-PMEAにおいて顕著であった(Fig. 2)。

この結果を考察するため、界面水和構造のダイナミクスの評価を行った。P3FM-*b*-PMEA膜は水と接触すると徐々に親水化する一方、F15-*b*-PMEA膜はただちに親水化する。また、AFM測定よりP3FM-*b*-PMEA膜はPBSで浸漬すると徐々に凹凸構造を形成し、凹部がP3FM、凸部がPMEAの弾性率に近い値を示した。これらの現象は、空気界面で偏析していたフッ素ブロックが、水中でPMEAブロックに変化していると考えられる。PBSで浸漬させなかったP3FM-*b*-PMEA膜のフィブリノーゲンの吸着量が高かった理由は、室温以上の T_g を有するP3FMが水中でPMEAブロックへの変化を抑制していたためと考えられる。F15-*b*-PMEAがPBSでの浸漬前後で吸着量にほとんど変化がなかった理由も、水中でのPMEAブロックへの変化を室温以下の T_m を有するF15が抑制しなかったためであると考察される。

以上の結果より、優れた生体親和性界面を構築有するためには、十分な中間水を含む鎖が効率的に水界面に配向する必要があると考えられる。

1) M.Tanaka et al., *Biomacromolecules*, 3, 36 (2002). 2) A. Kikuchi, *J. Colloid Interface. Sci.*, 158, 10 (1993).

Protein adsorption and hydration structure of fluorine-containing synthetic polymers

Ryohei Koguchi,^{1,2} Katja Jankova,^{1,3} Kyoko Yamamoto,² Masaru Tanaka¹

¹Soft Materials Chemistry, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

²Research Center, Asahi Glass Co., Ltd.

³Department of Energy Conversion and Storage, Technical University of Denmark

Tel: +81-92-802-6238, Fax: +81-92-802-6238, E-mail: ryohei-koguchi@agc.com

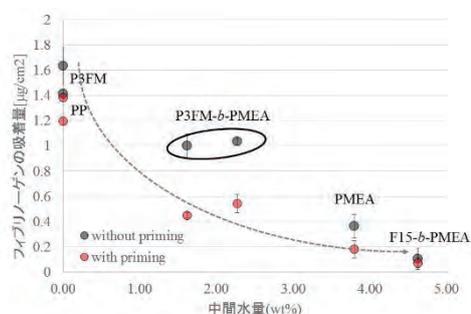


Fig. 2 Protein adsorption of fluorinated PMEA

ポリマーモノリスの形態制御と細胞培養基材への適用

¹京都大学化学研究所, ²物質・材料研究機構, ³山形大学有機材料システム研究推進本部, ⁴山形大学フロンティア有機材料システム創成フレックス大学院, ⁵富山大学大学院理工学研究部
○榊原 圭太¹, 吉川 千晶², 干場 隆志^{2,3,4}, 中路 正⁵, 辻井 敬亘¹

【緒言】連続空孔とポリマー骨格が共連続構造を織りなす高分子多孔体はポリマーモノリスと呼ばれ、高い気孔率と比表面積を反映した応用、例えば、物質分離やクロマト分析、リアクターなど、の観点から、勢力的に研究展開されており、近年では培養基材への適用も検討されている¹⁾。その有効な合成法として重合誘起スピノーダル相分離プロセスが注目され、すでに、エポキシ化合物をベースとした熱硬化反応系（逐次反応系）が確立されている²⁾。これまで演者らは、界面化学的手法によるポリマーモノリスの形態制御に取り組み、表面スキン層の除去、薄膜や粒子の合成、細孔サイズのコントロール、フィラー添加などを実現してきた^{3,4)}。これら形態制御された新しいモノリス材料は、細胞培養基材として有望と考える。本発表では、表面スキン層レスかつ異なる細孔径を有するエポキシ系モノリスを培養基材として用いた評価結果、および細孔径と細胞接着性の相関について報告する。

【実験】重合液（孔形成剤 poly(ethylene glycol)（分子量 200）、架橋剤 bis(4-aminocyclohexyl)methane（BACM）、エポキシモノマー 1,3-bis(*N,N'*-diglycidylaminoethyl)cyclohexane（TETRAD-C）の所定混合液）を厚さ 2 mm となるようにトレイに入れ、所定温度（ $T = 100, 110, 120, 130$ °C）で 1 時間の重合と洗浄によりモノリス板を得た。次に、細胞培養ウェルプレートのサイズに成型し、表面研磨することでモノリスディスクを作製し、培養基材として用いた。タンパク質の吸着量評価、モデル肝細胞 HepG2 を用い、原子間力顕微鏡による細胞接着力測定、細胞培養実験などを行った。

【結果と考察】モノリスディスクの走査型電子顕微鏡（SEM）画像を図 1 に示す。ディスク表面および内部（断面）が均一な細孔を有することを確認した。 $T = 100, 110, 120, 130$ °C で合成されたモノリスの平均細孔径はそれぞれ 380、300、170、70 nm と求められ、期待通り、重合温度が高いほど細孔径が小さくなった。ゆえに、重合温度の高いモノリスほど比表面積が増加した。単位面積あたりのタンパク質吸着量はいずれもほぼ同じ値を示したことから、種々モノリスの化学的表面特性はいずれも同等であると判断された。また、HepG2 細胞に対する接着力を測定したところ、いずれもほぼ同等の接着力を示し、モノリスの微細構造と細胞の初期接着には相関性が見られなかった。しかしながら、培養 1~4 日の長期的な接着においては接着量や接着形態などに差異が見られた。発表ではこれらの詳細について議論する。

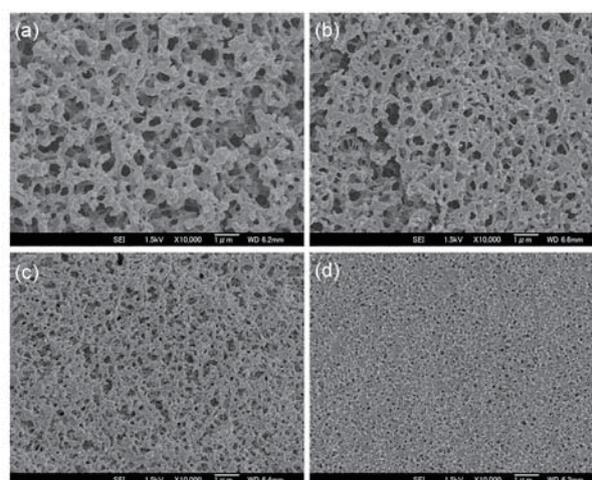


Figure 1 FE-SEM images of monolith disks prepared at (a) 100, (b) 110, (c) 120, and (d) 130 °C: top surface.

1) A. Löber, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 9138 (2008). 2) N. Tsujioka, et al., *Macromolecules*, **38**, 9901 (2005). 3) K. Sakakibara, et al., *J. Mater. Chem. A*, **5**, 6866 (2017). 4) K. Sakakibara, et al., *Polym. Chem.*, **9**, 414 (2018).

Polymer monolith materials with well-defined morphology for cell cultivation

Keita Sakakibara¹, Chiaki Yoshikawa², Takashi Hoshiba^{2,3,4}, Tadashi Nakaji-Hirabayashi⁵, Yoshinobu Tsujii¹

¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, ²National Institute for Materials Science, ³Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, ⁴iFront, Yamagata University, ⁵Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama.

Tel: +81-773-38-3168, E-mail: sakaki@scl.kyoto-u.ac.jp and yoshikawa.chiaki@nims.go.jp

標識酵素を含む各種酵素の長期安定性・高温耐熱性を高めるイオン液体の評価

¹ミヨシ油脂株式会社

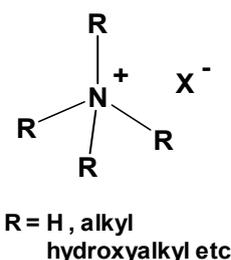
○金子 恒太郎¹, 河合 功治¹

【緒言】酵素は食品や医薬品分野の他、様々な分野において不可欠な材料であるが、非生理的環境下では容易に変性し、その優れた活性を失ってしまう場合が多く、酵素の安定化技術の探索が以前より行われてきた。特に近年は、バイオマテリアルの分野においても酵素、タンパク質を用いた生体構成材料の開発が盛んに行われており、酵素の安定化技術の確立が望まれている。

イオン液体は、不揮発性、高極性、導電性、流動性、低融点等の特異的な物性を有する常温で液体の有機塩であり、その用途は、電気化学や材料科学、反応溶媒、バイオマテリアルなど幅広い分野で注目され、応用検討が行われている。イオン液体のタンパク質保存溶媒への応用についても種々検討が行われている中、これまでに我々は、4級アンモニウム塩型イオン液体に着目し、検討を行ってきた。その中で、特定官能基を導入したイオン液体が酵素に対する高溶解性、長期安定性、耐熱性を付与することを見出した。

今回の発表では、本イオン液体の酵素安定化剤への応用を目指して、イオン液体濃度（高濃度から低濃度）と酵素安定化との相関、耐熱性の中でも、工業分野で必要とされる～60℃の高温条件下での安定化効果、免疫染色やELISAに使用される標識酵素として需要の高いペルオキシダーゼの長期安定性、耐熱性について検討した。

【実験】図1に示す各種4級アンモニウム塩型イオン液体を、既存の合成法に従って合成した。イオン液体の酵素保存性、耐熱性評価は、次のように行った。イオン液体の1～86%水溶液及びリファレンス水溶液（バッファーやアルブミン等の各種安定化剤）を調整し、酸化還元酵素、加水分解酵素、ペルオキシダーゼをそれぞれ室温で溶解した。溶解した溶液を25～60℃の恒温器で一定期間保存し、各期間経過後、保存液中の各酵素の酵素活性を測定することで評価を行った。



【結果と考察】各濃度の本イオン液体水溶液に酵素を溶解し、25～60℃で一定期間保存した酸化還元酵素、加水分解酵素の活性（イオン液体による酵素の長期安定化効果）は、低濃度から高濃度のいずれの水溶液濃度、25～60℃の保存温度においても、リファレンス水溶液（バッファーやアルブミン等の各種安定化剤）より高い酵素活性を示した。

Figure1 イオン液体の化学構造

さらに、本イオン液体水溶液を用いてペルオキシダーゼの安定化を試みた。溶液・室温保存が困難なペルオキシダーゼは、リファレンス水溶液（アルブミン等の各種安定化剤）の系では安定化効果が低かったが、本イオン液体溶液においては、高い活性保持性を示した。

以上の結果より、本イオン液体が、高温下、いずれの濃度においても各酵素の安定化効果に優れ、特に、安定性の低いペルオキシダーゼに対しても安定化効果を示すことが明らかとなった。これらの結果は、本イオン液体のカチオン、アニオン中の特定の官能基の存在が、酵素の活性保持効果、耐熱性向上に強く影響することを示し、本イオン液体が酵素を始めとする生体高分子の安定化剤への有用性が高いことが示唆された。

Long-term stability and thermo stability of various enzymes including labeling enzyme by ionic liquids

Kotaro Kaneko¹, Koji Kawai¹

¹ Miyoshi Oil & Fat Co. Ltd.

Tel: +81-3-3602-8791, Fax: +81-3-3690-3542, E-mail: KANEKOK@so.miyoshi-yushi.co.jp

生分解性ナノセルロースハイドロゲルの開発と細胞浸潤挙動の評価

¹物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点 バイオ機能分野
○西口 昭広¹, 田口 哲志¹

【緒言】

高分子の三次元網目構造からなる注入可能なハイドロゲル（インジェクタブルゲル）は、シリンドリまたはカテーテルを用いて、組織再生の足場として患部への注入が可能であることから、低侵襲治療に貢献すると期待される。しかしながら、化学反応による架橋を駆動力するインジェクタブルゲルでは、その多くが2液混合型であり、細胞毒性や操作の煩雑性が課題である。そこで本研究では、シングルシリンドリで注入可能なナノセルロース（NC）からなるチキソトロピー性インジェクタブルゲルを開発することを目的とする（Figure 1a）。NCとは、植物の細胞壁をトップダウン的に微細化することで得られるナノメートルサイズのセルロースコロイドであり、チキソトロピー性を有することで知られる。本研究では、生分解性を付与し、スルホン化されたNC（sNC）をゼラチンとコンポジット化することで、高い生体適合性を有する生体機能化インジェクタブルゲルを開発する。また、本ゲルに対する細胞浸潤挙動をラット皮下埋植試験によって評価した。

【実験】

ろ紙粉末を過ヨウ素酸ナトリウムによって酸化することで、アルデヒド化セルロースを作製した。そこに、ピロ亜硫酸ナトリウムを加えることでスルホン化を行い、超音波ホモジナイザーによって解繊することで、sNCを作製した。3 wt%のsNC溶液（pH=8）と20 wt%のブタゼラチン（Mw=100 kDa）溶液（pH=8）を当量混合後、静置することで、ハイドロゲルを得た。粘弾性試験によって、周期的なひずみの変化（1%と1000%）に対する弾性率を測定することで、ゲルのチキソトロピー性を評価した。また、マウス線維芽細胞（L929）をsNCゲル上に播種し、培養することで細胞接着性を評価した。

【結果と考察】

得られたsNCは、スルホン基間の静電反発によって、ナノメートルスケール（直径： <20 nm、長さ： >1 μ m）へと微細化されていた（Figure 1b）。sNCをブタゼラチン溶液と混合することで、数秒以内にゲル化反応が起こり、ハイドロゲルを形成した。一方で、粘弾性試験において、ひずみを1000%与えた直後でも、貯蔵弾性率が瞬時に回復する挙動が観察されており、sNCゲルがチキソトロピー性を有していることが示された（Figure 1c）。さらに、アクチン染色の結果より、マウス線維芽細胞はsNCゲル上に接着、伸展している様子が観察され、ゲルの高い接着性が確認された（Figure 1d）。さらに、ラット皮下への埋植試験において、多くの細胞がゲル内へと浸潤している様子が示された。本ゲルは、インジェクション可能であることから組織再生を促す足場材料として、心筋梗塞治療や脳動脈瘤治療などへの応用が期待される。

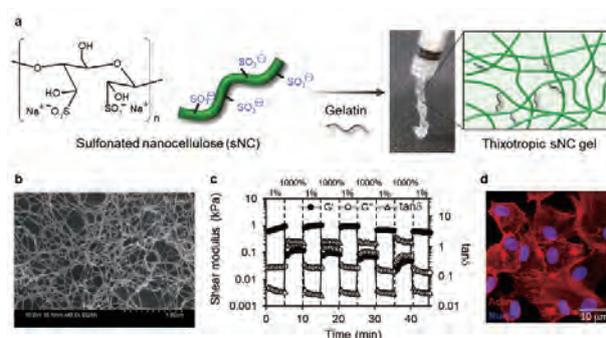


Figure 1. (a) Schematic of preparation of thixotropic, sulfonated nanocellulose (sNC) gel. (b) Scanning electron microscopic image of sNC. (c) Rheological measurement of sNC gels when strain was periodically varied. (d) fluorescence microscopic image of mouse fibroblasts (L929) cultured on sNC gel.

Development of biodegradable nanocellulose hydrogels and evaluation of cell invasion

Akihiro Nishiguchi¹, Tetsushi Taguchi¹

¹Biomaterials Field, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science

Tel: +81-29-860-4987, E-mail: NISHIGUCHI.Akihiro@nims.go.jp

生理条件で活発に線維化する魚由来コラーゲン

¹東京都立産業技術研究センター バイオ応用技術グループ, ²日本電熱株式会社
 ○畑山 博哉¹, 柚木 俊二¹, 大藪 淑美¹, 成田 武文¹, 杉本 清二¹, 小林 千人², 門 雅莉²

【緒言】 コラーゲンは生体内環境 (37°C、中性) において、自己集合によって細胞接着性を有するナノフィブリルを形成するため、細胞の3次元包埋培養用ゲル基材として広く利用されている。コラーゲン原料としてはブタ・ウシ由来が一般的だが、細胞を包埋したコラーゲンを再生医療に用いる場合、宗教上の理由から魚由来のコラーゲンが要求される国もある。我々は、ウシ・ブタ由来コラーゲンと同等の熱安定性を有する魚由来コラーゲンを探索し、東南アジア原産のバラマンディ (*Lates calcarifer*) の鱗から得られるコラーゲン (BC) が 37°C において活発に線維化することを見出した。本発表では、BC のキャラクターゼーションおよび3次元包埋基材としての有用性について報告する。

【実験】 ペプシンを含有した 0.5M 酢酸中でバラマンディ鱗を攪拌し、コラーゲンを抽出した。常法の塩析および透析により精製 BC を得た。比較として、市販のブタ腱由来コラーゲン (PC)、市販の魚鱗由来コラーゲン (FC) を用いた。酸性コラーゲン水溶液を 10°C から 50°C まで昇温した時の 221 nm における円二色性 (CD) を追跡し、変性温度を決定した。線維形成能を評価するため、回転型レオメーターを用いて、10°C から 37°C まで昇温した場合の中性コラーゲンゾル (濃度 0.27%) の貯蔵弾性率 (G') を追跡した。さらに、温度を 37°C から直線的に昇温し、線維ゲルの熱安定性を評価した。線維形成能の評価に用いたものと同様の中性コラーゲンゾルを加温して線維化させ、走査型電子顕微鏡 (SEM) により線維構造を観察した。酸性コラーゲンの超遠心分析により、コラーゲンのモノマーを超える分子量成分 (非アテロ化成分) の含有量を決定し、コラーゲン精製度について評価した。

【結果と考察】 再生医療用途として有用な PC と同様に、BC は 37°C で線維を形成した。分子状態での BC の変性温度は PC よりも低い、中性の BC ゾルは 37°C に至る前に鋭い G' の上昇を示し (図 1)、白濁した熱安定性の高い線維ゲルを形成した。ゲル化がコラーゲンの線維化によるものであることが SEM 観察から示された。BC ザルの G' は 37°C 昇温直後にプラトー (108 Pa) に達し、同濃度の PC ザルに匹敵する硬さ (118 Pa) を示した (図 1)。更にレオメーターの温度を上昇させたところ、BC ザルの軟化は 47°C 付近まで生じなかった。一方、FC の変性温度は BC 分子の変性温度 (約 36°C) と同様にもかかわらず、37°C における線維形成能は低かった。

BC が熱的に安定な線維ゲルを形成できた理由については未解明だが、アミノ酸組成や線維化の核が原因ではないことが示唆された。アミノ酸組成分析により BC と FC で差異がみられず、超遠心分析により BC の分子量分布はほぼモノメリックであることが確認された。BC の優れた線維化能および線維の熱安定性がどのような構造因子によるものかを明らかにすることが今後の研究課題である。

以上により、BC は、PC と同様に再生医療用コラーゲン原料としての利用が期待される。今後は、BC をゲルマトリクスとした細胞の包埋培養を実証する。

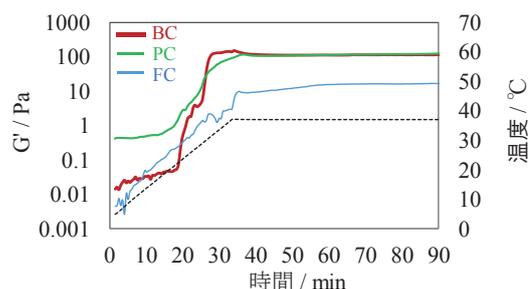


図 1 生理温度への昇温による中性コラーゲンゾルの貯蔵弾性率の変化 (図中の破線は温度変化を示す。)

A fish collagen with a capacity to form fibrils actively under physiological condition

Hirosuke Hatayama¹, Shunji Yunoki¹, Yoshimi Ohyabu¹, Takefumi Narita¹, Kiyoji Sugimoto¹, Kazuto Kobayashi², Men Yali²

¹Biotechnology group, Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute,

²NIHON DENNETSU CO.,LTD.

Tel: +81-3-5530-2671, Fax: +81-3-5530-2629, E-mail: hatayama.hirosuke@iri-tokyo.jp

In vitro 皮膚刺激性試験に用いる再構築ヒト表皮モデルの性能評価

¹ 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

○加藤 玲子, 小森谷 薫, 宮島 敦子, 齋島 由二

【緒言】医療機器の刺激性は動物を用いた皮膚刺激性試験、皮内反応試験、眼刺激試験等の *in vivo* 試験により評価されているが、近年、ISO/TC194/WG8 において 2 種類の再構築ヒト表皮(RhE)モデル(EpiDermTM EPI-200 RhE モデル(EpiDerm)、SkinEthicTM RHE モデル(SkinEthic))を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法の性能を検証する国際ラウンドロビンスタディ(RRS)が行われ、その有用性が示された。一方、我々は RRS と同一の被験物質を用いて国産 RhE モデルである LabCyte EPI MODEL(LabCyte)の性能検証を行い、他の 2 種の RhE モデルと同様に医療機器の皮膚刺激性評価に適用できることを示した(第 39 回日本バイオマテリアル学会大会: 2P-033)。RRS プロトコルでは、陽性対照物質として 1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)が用いられており、各 RhE モデルで程度の差はあるが、組織損傷が激しく、洗浄時に剥離・破損してしまうことが報告されていたことから、本研究では、各 RhE モデルで陽性対照として許容できるより最適な SDS 濃度の検討を行った。また、当試験法は細胞生存率を指標として細胞の損傷を評価することで間接的に刺激性の有無を判定していることから、刺激性と直接関連する炎症性サイトカイン(IL-1 α)の発現挙動を追跡し、3 種の RhE モデルで比較検討した。

【実験】被験物質としては、0.05%~1% SDS を使用した。各濃度の被験物質を 18 時間暴露後、(D)PBS で十分洗浄し、後培養することなく、直ちに MTT 法を用いて細胞生存活性を測定した。陰性対照としては、(D)PBS を用いた。RRS プロトコルに従い、陰性対照に対する被験物質の相対生存率を算出し、相対生存率 50%以下を刺激性陽性と判定した。培養上清中の IL-1 α 量は ELISA 法にて測定し、陰性対照の発現量を 1 として相対比 (S/N 比) を算出した。

【結果と考察】MTT アッセイの結果、EpiDerm の相対生存率は 0.25% SDS で 17.5%となり、それ以上の濃度では 3%以下に低下した。SkinEthic の相対生存率は 0.05%SDS で 32.6%であり、それ以上の濃度では 3.5%以下となった。また、LabCyte では 0.075% SDS で相対生存率が 42.8%となり、それ以上の濃度では 5.5%以下であった。組織損傷に係る肉眼所見として、EpiDerm は 1% SDS、SkinEthic は 1%及び 0.5% SDS の一部で剥離が観察された。LabCyte は 1% SDS で組織の損傷が激しく洗浄過程で原型を止めている組織がなく、0.5%及び 0.25% SDS の一部でも剥離が観察された。以上の結果から、EpiDerm、SkinEthic 及び LabCyte では、それぞれ 0.25%、0.075%及び 0.1%以上の SDS 濃度があれば陽性対照として十分であるが、ハンドリングも考慮した場合、陽性対照として 3 種の RhE モデルに共通して適用できる SDS 濃度は 0.5%であることが判明した。IL-1 α 産生量は、3 種のモデルともに低濃度域では SDS の濃度依存的に増加したが、高濃度域では一定濃度を境に徐々に減少した。EpiDerm は 0.25%、SkinEthic 及び LabCyte は 0.1% SDS 刺激時に最も高い IL-1 α 誘導能を示した。その際の IL-1 α 産生量は、それぞれ約 370 pg/mL、500 pg/mL 及び 940 pg/mL であり、陰性対照に対する S/N 比は約 48 倍、約 51 倍及び約 1620 倍であった。一方、EpiDerm の場合、0.05%、0.1%及び 0.125% SDS 刺激時の相対生存率は、いずれも 90%前後であったが、IL-1 α 産生量は濃度依存的に増加し、S/N 比がそれぞれ 5 倍、7.5 倍及び 14.6 倍となった。LabCyte にも同様の傾向が認められ、0.05%及び 0.625% SDS 刺激による相対生存率は 95%以上であったが、S/N 比は 85 倍及び 290 倍に増加した。これらの結果から、被験物質の相対生存率が 50%以上あった場合でも二次マーカーとして炎症性サイトカインの発現量を測定することで、被験物質の刺激性の有無をより正確に判定できることが明らかとなった。

Performance evaluation of reconstructed human epidermal models for *in vitro* skin irritation test

Reiko Kato, Kaoru Komoriya, Atsuko Miyajima, Yuji Haishima

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

Tel: +81-44-270-6544, Fax: +81-44-270-6545, E-mail: r-kato@nihs.go.jp

細胞低接着性コラーゲンによる神経細胞の活性化と組織再生機能の検証

¹近畿大学生物理工学部, ²藍野大学中央研究施設, ³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

○國井沙織¹, 兼清健志², 中野法彦², 加藤暢宏¹, 尾前 薫³, 井出千束², 森本康一¹

【緒言】神経損傷における再生医療において中枢神経の再建は未だ困難である。例えば、自家神経束の移植や自家幹細胞移植などが試みられているが、必ずしも良好な治療法ではない。その主な理由として、切断された神経束は再生能力が低く、ギャップジャンクションの形成が著しく低下することが挙げられる。よって、断裂神経束を再建する再生医療において、神経細胞の増殖と誘導、分化、神経突起の伸長、ジャンクションを早期に形成させる材料開発とその検証が急務である。我々はこれまでに培養細胞が自発的に接着型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_{ol}, Low Adhesive Scaffold Collagen) を開発し (2017 年度本大会で発表)、LASC_{ol} 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、1) LASC_{ol} のゲル化特性をレオロジー特性評価装置により測定し、2) ラット海馬組織から回収した神経細胞を LASC_{ol} 塗布培養皿で培養して神経突起伸長細胞の増加、突起形成速度の高速化、突起長の増大を調べた。さらに、3) ラット脊髄損傷モデルを用いた動物実験で LASC_{ol} ゲルを損傷部に注入し、*in vivo* での神経再生の初期治癒効果を検討したので報告する。

【方法と材料】LASC_{ol} 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_{ol} を調製した。LASC_{ol} 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) にて測定開始 30 分後の貯蔵弾性率 (G') を測定した。細胞実験: LASC_{ol}, アテロコラーゲン, ポリ-L-リシンを塗布したチャンバースライドに、ラットの海馬由来神経細胞あるいは大脳由来アストロサイトを播種し、細胞形態を経時的に観察した。次に、神経細胞の神経突起の経時的変化を抗 β -tubulin 抗体を用いた免疫化学染色により観察した。さらに、抗 ALDH1L1 抗体を用いた免疫化学染色によりアストロサイトの各足場への接着能と増殖能を調べた。動物実験: 雌の 6 週齢の SD ラットを麻酔下で標準的なニューヨーク大学の重量落下装置 (W=10 g, H=7.5 cm, 1 回) により圧挫損傷モデルを作製した。損傷直後に LASC_{ol} ゲルあるいは PBS を脊髄損傷部に注入した。注入 8 日後の脊髄組織標本を作製し、GFAP とリン酸化 GAP-43 に対する抗体を用いて免疫組織染色により陽性細胞を観察した。

【結果と考察】LASC_{ol} ゲルの作製と特性: 14 mg/mL までのブタ皮膚由来 LASC_{ol} 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_{ol} 濃度に依存して増大した。細胞実験: LASC_{ol} 上で培養した神経細胞は、抗 β -tubulin 抗体で染色された神経突起が著しく伸長し、また神経細胞の生存率が増大することが明らかになった。一方、アストロサイトは LASC_{ol} 上では他の足場と比較して接着する細胞が極端に減少し、増殖率が抑制された。動物実験: 圧挫損傷脊髄に注入した LASC_{ol} ゲルでは、リン酸化 GAP-43 が陽性な細胞集団が観察され、損傷部位に内在性の神経細胞から再生軸索が伸びてきていることが示された。よって、脊髄損傷が生じたラットは LASC_{ol} ゲルの注入によって、損傷部分に神経細胞が誘導されることが示唆された。

【謝辞】本研究は、AMED 橋渡し研究戦略的推進プログラム (大阪大学拠点, A-75 (K.M.)) 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。

Evaluation of Low Adhesive Scaffold Collagen gel for activation and regeneration of nerve tissue

Saori Kunii¹, Kenji Kanekiyo², Norihiko Nakano², Nobuhiro Kato¹, Kaoru Omae³, Chizuka Ide², Koichi Morimoto¹

¹Department of Genetic Engineering, Kindai University, ²Central Biomedical Laboratory, Aino University School of Health Science, ³Translational Research Center for Medical Innovation

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

細孔形成能を有する 3D プリンタ用ポリ乳酸フィラメントの開発

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生体材料学
○平田伊佐雄, 加藤功一

【緒言】

近年、熱融解積層方式の 3D プリンタを用いた硬組織再建用スキャフォールド作製の研究が急速に進んでいる。しかしながら、その造形材であるフィラメントはポリ乳酸(PLA)、乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)など単一組成の生体分解性樹脂しか用いられておらず、スキャフォールドの機械的特性・骨伝導能・細胞接着性・生体内分解性などの特性を制御する方法が限定されている。

本研究の目的は、生体分解性スキャフォールド造形用フィラメントのバリエーションの拡大を目的とし、熱溶融混練法を用いた粉体混合を行うことにより、単一組成フィラメントと比べて様々な特性を有する 3D プリンタ用フィラメントを開発した。組織工学用スキャフォールドの素材として、生体分解性高分子である PLA は研究・開発に多く用いられている。しかし、PLA は生体分解速度が遅く機械的強度も高いため、これらの特性を制御する必要がある。PLA の機械的強度・生体分解速度は、内部に細孔を導入することにより調整できると考えられる。今回、内部への細孔の導入を目指した 3D プリンティング PLA フィラメントの作製について報告する。

【実験】

45~90 μm に整粒した塩化ナトリウム(NaCl)と 1.0 mm 以下の PLA ペレットを、ボールミル・クラッシュミルと篩を用いて調製した。これらの粉砕物を二軸押出機で混練し、混練ペレットを作製した。作製した混練ペレットから直径 1.75 mm の NaCl 混練 PLA フィラメントを、一軸押出機を用いて作製した。NaCl 混練 PLA フィラメントを 3D プリンタに装填し、NaCl 混練 PLA の 3D 印刷体を作製した。

NaCl 混練 PLA フィラメント・印刷体を水に 1~7 日間浸漬し、内部の NaCl の溶出重量を測定した。また、NaCl 混練 PLA のペレット、フィラメント、3D 印刷体の内部の NaCl を X 線 CT にて観察した。

【結果と考察】

NaCl は水に溶解するため、NaCl 混練 PLA フィラメントで作製した 3D 印刷体を水に浸漬すると NaCl 微粒子は溶解し、細孔が導入されると予想される。このフィラメントで作製した 3D 印刷体を水に浸漬することにより、浸漬前は透明性があった印刷体は白濁した。また、浸漬後は、印刷体の重量は顕著に減少した。これより、印刷体内の NaCl 微粒子が溶解し細孔となったため光散乱の度合いが変化したと思われる。また、これらの 3D 印刷体を X 線 CT で観察した結果(図 1), 印刷体表面の NaCl は水浸漬後、速やかに溶出し細孔が形成されていた。また、断層像から印刷体内部の NaCl は 7 日間の水浸漬によって、ほぼすべて溶出したことがわかった。

NaCl 混練 PLA フィラメント作製時に NaCl の混合量を変化させることにより、3D 印刷体の空隙率を制御することが可能である。これにより造形物の機械的性質・骨伝導能・細胞接着性・生体内分解性などの特性を制御・調整できるものと期待できる。

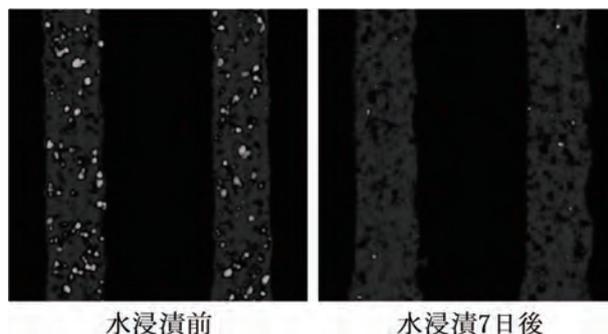


図 1 3D 印刷体の X 線 CT 断層像

Development of micropore-forming polylactide filaments for use in 3D printing

Isao Hirata, Koichi Kato

Department of Biomaterials, Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

Tel: +81-82-257-5648, Fax: +81-82-257-5649, E-mail: isao@hiroshima-u.ac.jp

創傷被覆材への応用を指向したシルクフィブロインの構造制御と細胞との相互作用解析

¹奈良女子大学 生活環境学部, ²国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部, ³農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門, ⁴信州大学 繊維学部

○橋本 朋子¹, 道法 志帆¹, 大槻 直美¹, 佐野 奈緒子¹, 山岡 哲二², 亀田 恒徳³, 玉田 靖⁴, 黒子 弘道¹

【緒言】シルクフィブロインは長く外科用縫合糸としての実績をもち、さらに近年では、組織再生の足場材料としても広く研究されている。このシルクフィブロインのタンパク質二次構造は、強度など材料としての物性のみならず、機能性分子の固定化にも寄与すると考え、われわれは、これまでに、創傷被覆材への応用を指向して二次構造変化を利用した機能性ペプチドのシルクフィブロインへの固定化を試みている。さらに、表面近傍の二次構造の含有率やその二次元的な分布が、材料上の細胞の様々な機能に影響すると考え、本研究では、 β シートやヘリックス構造などのタンパク質二次構造含有率が異なるシルクフィブロインを作製し、フィルムの表面近傍の二次構造の含有率やその分布が増殖や遊走などの細胞の挙動に与える影響について調べた。

【実験】既報に従い調製したシルクフィブロイン水溶液を基材に滴下し室温または50°Cで乾燥させた後、各種アルコールの80%水溶液処理を組み合わせ、種々のフィルムを得た。Attenuated Total Reflection (ATR) 法によるFTIRスペクトル測定、顕微ラマンスペクトル測定により、シルクフィブロインフィルム表面近傍のタンパク質二次構造含有率、および二次構造含有率の分布について調べた。続いて、マウス繊維芽(NIH/3T3)細胞を用いて、各フィルム上での細胞増殖評価、および遊走能評価のためのスクラッチアッセイを行った。

【結果と考察】図1にアルコールとしてメタノールを用い作製したフィルムのATR-FTIR測定による構造解析の結果を示す。フィルム作製時の乾燥温度(RT、50)、および80%メタノール水溶液を用いた処理の有無(Me、Non)の組み合わせにより、RT/Non、RT/Me、50/Non、50/Meと表記している。得られた結果より、乾燥温度やアルコール処理の有無、またアルコールの種類によって異なる二次構造含有率を有するフィルムの作製が確認できた。また、顕微ラマンのマッピング測定にて解析した結果、フィルム表面近傍における二次構造の含有率が二次元的に不均一となる傾向が示された。さらに、各フィルムとNIH/3T3細胞を用いた評価結果より、フィルム表面近傍の二次構造含有率が、細胞の増殖や遊走に影響を与える可能性が示唆された。

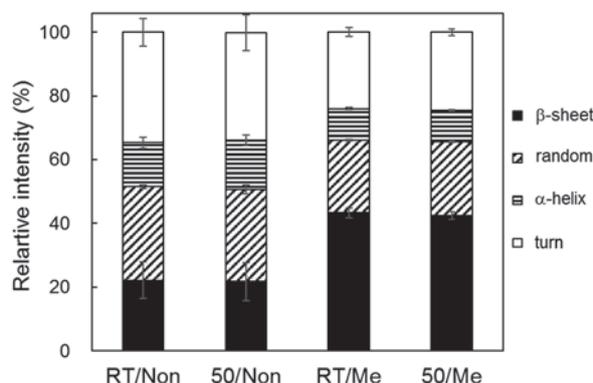


Figure 1. Relative intensity of secondary structures in silk fibroin films. (n=5)

Secondary structure and interactions with fibroblast of silk fibroin films for wound dressing applications

Tomoko Hashimoto¹, Shiho Douho¹, Naomi Otsuki¹, Naoko Sano¹, Tetsuji Yamaoka², Tsunenori Kameda³, Yasushi Tamada⁴, Hiromichi Kurosu¹

¹Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University, Kitaouya-Nishimachi, Nara 630-8506, Japan, ²Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, ³National Agriculture and Food Research Organization, 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan, ⁴Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

Tel & Fax: +81-742-20-3462, E-mail: hashitomo@cc.nara-wu.ac.jp

細胞接着性ペプチド固定化リン脂質ポリマーブラシ表面における細胞接着挙動解析

東京大学大学院工学系研究科
○井上 祐貴、石原 一彦

【緒言】 バイオデバイスや医療デバイスを適切に創製するには、マテリアル表面における細胞接着を使用環境や目的に応じて制御することが求められる。これには、マテリアル表面上の細胞接着性ペプチドと細胞膜上のレセプタータンパク質との相互作用が、細胞接着挙動や接着細胞の機能に与える影響を明確にすることが重要である。これを実現するためには、細胞接着性ペプチドの存在状態が明確な細胞足場環境が必須である。マテリアル表面で形成されるタンパク質吸着層の構造は水中で動的に変化しており、細胞接着性ペプチドがタンパク質内のフレキシブルなドメインに存在する場合もある。これらのことは、細胞接着性ペプチドの微小な変位や可動性が、細胞接着に大きな影響を与えることを示唆する。そこで本研究では、細胞接着性ペプチドの配置が明確な表面により、その動的特性が細胞接着挙動に与える影響を定量的に解析することを目的とする。このため、ナノオーダーで明確なポリマーブラシ構造の末端に細胞接着性ペプチドが固定化された表面を作製した。また、細胞接着性ペプチドの特性が細胞接着挙動に与える影響を高感度で解析するため、タンパク質吸着を完全に排除するリン脂質ポリマーブラシ層を用いた。特に、ポリマーブラシ層のグラフト密度によって、末端の細胞接着性ペプチドの可動性を制御した。

【実験】 原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始基およびヒドロキシ基を有するアルカンチオールを用いて、異なる開始基密度を有する表面を金基板上に作製し、表面開始型 ATRP 法により、重合度 400 の poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) ブラシ表面を作製した。続けて、Huisgen 環化付加反応を利用して、PMPC 鎖の末端に環状 RGD (cRGD) を固定した。このとき、細胞接着性の低い RDG を用いることで、cRGD の固定化密度を制御した。エリプソメーターを用いて PMPC グラフト層の乾燥膜厚を測定し、グラフト密度を解析した。エネルギー散逸型水晶振動子マイクロバランス法(QCM-D)を用いて、グラフト層形成に伴うエネルギー散逸変化(ΔD)および共振周波数変化(Δf)を測定し、 $\Delta D/\Delta f$ 値により表面の粘弾性を評価した。10%ウシ胎児血清(FBS)溶液からのタンパク質吸着量を QCM-D 測定によって定量した。ヒト子宮頸ガン(HeLa)細胞を用いて、播種 1 時間後の接着細胞数をカウントした。細胞播種密度を 2.0×10^4 cells/cm² とした。

【結果と考察】 エリプソメーターによる膜厚測定から、開始基濃度を変化させることにより、グラフトした PMPC 鎖の密度を 0.01-0.18 chains/nm² の範囲で制御できた。QCM-D 測定の結果、グラフト密度の増加に伴い、 $\Delta D/\Delta f$ 値は減少した。PMPC 鎖がパッキングされるにつれて、水中での PMPC 鎖の可動性が低下したため、ポリマー層の粘弾性が低下したと考えられる。作製した表面への FBS からのタンパク質吸着量は、グラフト密度によらず 30 ng/cm² 以下であった。さらに、プロモ変換もしくは RDG 末端の PMPC グラフト表面には細胞が全く接着しなかったのに対して、cRGD 末端の PMPC グラフト表面には細胞接着が観察された。これらの結果から、末端に導入した細胞接着性ペプチドのみにより細胞接着を誘起できる表面を構築できた。Fig. 1 に示すように、異なる $\Delta D/\Delta f$ 値を有する cRGD 固定化 PMPC グラフト表面においては、 $\Delta D/\Delta f$ 値の増加に伴い細胞接着密度が増加した。この結果から、細胞接着性ペプチドの可動性が高い表面で、膜タンパク質との相互作用が有利となり、より多くの細胞接着性ペプチド-膜タンパク質結合が生じていることが示唆された。

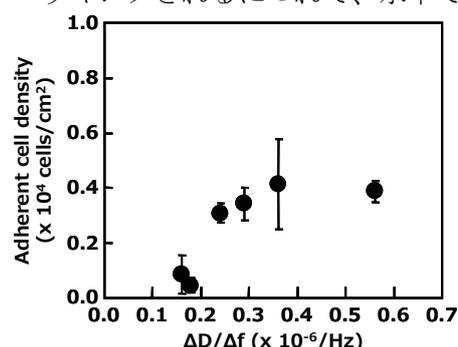


Fig. 1. Relationship between adherent cell density and $\Delta D/\Delta f$ value at cRGD-immobilized PMPC grafted surfaces.

Cell adhesion on cell adhesive peptide-immobilized phospholipid polymer brush surface

Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara (Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan) Tel: +81-3-5841-7124, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: inoue@mpc.t.u-tokyo.ac.jp