

ポスター発表

第2日：11月13日（火）

ペプチドアンカーを介した ePTFE 基材への細胞接着性リガンドの安定な直接固定化

¹ 関西大学化学生命工学部, ² 大阪医科大学研究支援センター, ³ 関西大学先端科学技術推進機構, ⁴ 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

○西岡 悟¹, 伊井 正明², 平野 義明^{1,3}, 山岡 哲二⁴, 柿木 佐知朗^{1,3,4}

【緒言】 延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)は、柔軟性に優れた撥水性の高分子材料であり、安定なアルブミン吸着層の形成にもとづく優れた抗血小板粘着性を示す。それゆえ、ePTFE 製人工血管は小口径を中心に広く利用されているが、血小板だけでなく血管内皮細胞も接着しないため、長期間埋入時には不完全な内膜再生によって閉塞する。ePTFE 製人工血管内腔面への細胞接着性ペプチドの固定化による表面改質はこれまで多く研究されてきたが、未だに臨床応用されるには至っていない。我々はアミノ酸のチロシンを酸化で生じるキノンを利用した ePTFE 基材表面へのペプチドの直接固定化に成功している^{1,2)}。しかし、ePTFE へのペプチドの固定化量が少ないためか、細胞の接着が僅かしか亢進されなかった。そこで本研究では、ePTFE 表面のゼータ電位が負であることとキノンがアミノ基とマイケル付加反応する点に注目して、各 3 残基のチロシンとリジンでなる(YK)₃ アンカーを新たに設計し、その酸化を介した ePTFE 基材上へのインテグリン $\alpha_4\beta_1$ リガンド(Leu-Asp-Val)の安定かつ高効率な固定化を試みた。

【実験】 Ac-YG₃LDV(AcY)および Ac-(YK)₃G₃LDV(Ac(YK)₃)の水溶液 (1.0 mM)に ePTFE 基材を浸漬し、CuCl₂(0.04 eq.)と H₂O₂(4.4 eq.)を添加して 50°C で 24 時間反応させた。反応後の ePTFE 表面の水濡れ性を水接触角計で、表面の元素組成および固定化ペプチドの安定性を X 線光電子分光(XPS)でそれぞれ解析した。さらに、ペプチドを固定化した ePTFE 上にヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)を播種・培養し、初期および長期における接着挙動を評価した。

【結果と考察】 Ac(YK)₃ で反応後、ePTFE 表面の水接触角は約 35°減少し、AcY 反応後と比較しても 20°も小さくなった。反応後の XPS での解析では、ペプチド由来の窒素のピークが検出され、基材由来のフッ素のピーク強度が減少した。この傾向は Ac(YK)₃ でより顕著であり、アンカー部のチロシン残基の増加とリジン残基の導入による ePTFE へのリガンド固定化効率の向上が示唆された。また、固定化した Ac(YK)₃ は SDS もしくは NaCl 水溶液による洗浄後も維持され、AcY と比較して安定な固定層を形成していることが示唆された(Fig. 1)。さらに、AcY よりも Ac(YK)₃ 固定化表面により多くの HUVEC が接着し、8 日間の培養では細胞の増殖も認められたことから、(YK)₃ アンカーによるリガンド固定化効率の向上が HUVEC の安定な接着と増殖を誘引することが示唆された。

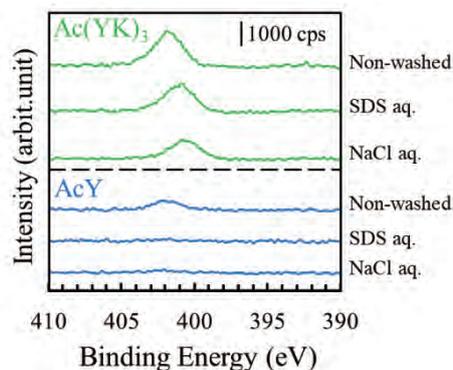


Fig.1 XPS analysis (N 1s) of ePTFE surfaces immobilized with AcY or Ac(YK)₃ after washing with SDS or NaCl aqueous solution.

参考文献

- 1) S. Kakinoki and T. Yamaoka, *Bioconj.Chem.*, 26(2015)639-644.
- 2) S. Kakinoki, K. Takasaki, T. Yamaoka et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*, 106A(2018)491-499.

Stable and direct immobilization of cell adhesion ligand on ePTFE substrate using peptide anchor

Satoru Nishioka¹, Masaaki Ii², Yoshiaki Hirano^{1,3}, Tetsuji Yamaoka⁴, Sachiro Kakinoki^{1,3,4,*}

¹Department of Chemistry and Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, ²Research and Development Center, Osaka Medical College, ³ORDIST, Kansai University, ⁴Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

*Tel and FAX: 06-6368-3033, *E-mail: sachiro@kansai-u.ac.jp

異なる基底膜構造を有する脱細胞化血管における細胞挙動

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、²大阪工業大学 生命工学科
○小林真子¹, 近藤真由香¹, 橋本良秀¹, 藤里俊哉², 木村剛¹, 岸田晶夫¹

【緒言】近年、生体組織から細胞成分を除去した脱細胞化生体組織が開発され、高い生体適合性および機能性を持つことが注目されている。我々は高静水圧（HHP法）によって脱細胞化血管を作製し、*in vivo* で優れた開存性を示すことを見出し¹⁾。この理由としてHHP法による脱細胞化血管では、血管内腔の基底膜構造や機能が維持され、内皮細胞などのレシピエント細胞がリクルートされた結果、高い抗血栓作用を有するのではないかと推察している。内皮細胞のリクルートが、高い抗血栓性に必要であることは、脱細胞化血管内腔にREDVペプチドを固定化した小口径人工血管の研究でも報告されている²⁾。これまでに細胞の接着や形態に血管基底膜の形状および構造が影響することも示してきた³⁾。本研究では、HHP法やSDS法により得られた脱細胞化血管の内腔表面上に血管内皮細胞（HUVEC）を播種し、その接着性や機能発現を解析することで、これまでに報告した血管内腔の基底膜構造の細胞挙動への影響に加え、基底膜の生理機能の解明を目指す。

【実験】ブタの大動脈（内径1cm、長さ4cm程度）を1000MPa、30°Cの条件で高圧印加し、洗浄過程を経ることでHHP脱細胞化血管を作製した。また、界面活性剤（SDS）を用いた脱細胞化として、異なる3種類のSDS法（Method 1, 2, 3）にてSDS脱細胞化血管を作製した。得られた脱細胞化血管をH-E染色、SEM観察およびDNA定量にて評価した。さらに、作製した脱細胞化血管上にヒト血管内皮細胞（HUVEC）を播種し、細胞の接着性、増殖性を検討し、内皮細胞機能をRT-PCRによるmRNA発現量解析にて試みた。

【結果と考察】

SDS処理による脱細胞化では、繊維間に隙間の拡大が示され、基底膜構造が維持されず、細胞核の完全な除去が示されなかった（Fig1(B), (C), (D)）。一方で、HHP法では、基底膜構造が維持され、細胞の残渣がほとんど認められなかった（Fig1(E)）。以上の結果より、HHP処理は、SDS処理と比較して、血管内腔の基底膜構造を維持したまま脱細胞化できることが示唆された。発表では、作製した異なる基底膜構造を有する脱細胞化血管を用いて、その基底膜表面上でのHUVECの細胞接着の様子や内皮細胞の機能発現に関連する遺伝子の発現量解析を行うことで基底膜の生理機能について発表する予定である。

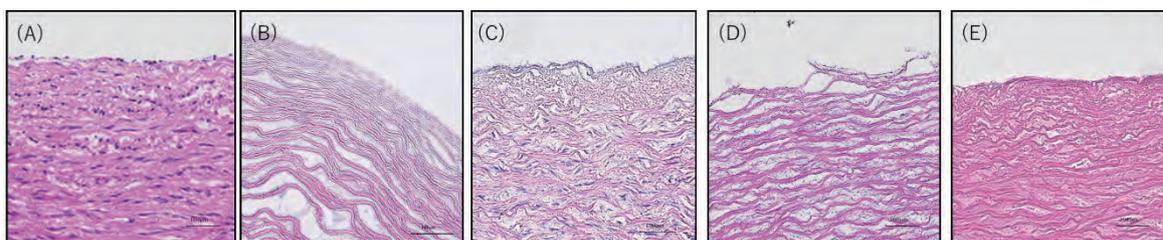


Figure 1. Photographs of H-E staining of porcine aorta. (A) Untreated aorta, (B) Method 1 SDS decellularized aorta, (C) Method 2 SDS decellularized aorta, (D) Method 3 SDS decellularized aorta, (E) HHP decellularized aorta

【参考文献】1) S.Funamoto, et al., *Biomaterials* 31, 3590-3595 (2010), 2) A.Mahara, et al., *Biomaterials* 58, 54-62 (2015), 3) 木村剛 他、第47回医用高分子シンポジウム講演要旨集, 129-130, 2018

Cell behavior on the decellularized aorta with various basement membrane structures

Mako Kobayashi¹, Mayuka Kondo¹, Yoshihide Hashimoto¹, Toshiya Fujisato², Tsuyoshi Kimura¹, Akio Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ² Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology,
Tel: +81-03-5280-8028, E-mail: kishida.mbme@tmd.ac.jp

機能性ペプチドを用いた3次元積層造形 CCM 合金の表面処理と細胞接着性の改善

¹山形大学大学院理工学研究科, ²物質・材料研究機構, ³NTT データエンジニアリングシステムズ
○右田 聖¹, 齊藤 雄太¹, 山崎 智彦², 蘇亜拉图³

【緒言】 コバルトクロムモリブデン (CCM) 合金はその力学的・化学的性質から、人工関節の摺動部や義歯床、ステントの体躯として用いられている。近年の付加製造 (AM) 技術とりわけ 3 次元造形技術の発達により、CCM 合金製のデバイスも AM 法によって作成することが可能になった。しかしながら、その製造工程において生体機能性を付与することはできない。このためステントのように埋植後早期に内皮化されることが望ましいデバイスにおいては、適切な表面処理が必要となる。我々はこれまでに、CCM 合金に特異的に結合する機能性ペプチドを探索し、その配列を明らかにしてきた。本研究では、これらのペプチド配列のなかで、3 次元積層造形した CCM 合金 (3D-CCM) に対して特異的な結合性を示す配列について検討を行った。また、この CCM 結合ペプチドに細胞接着性モチーフである GRGDS を連結し、血管内皮細胞の接着性向上について検討した結果も併せて報告する。

【実験】 CCM 粉末には EOS MP1 (Co-28Cr-6Mo) を用いた。3 次元積層造形には EOSINT M システムを用いた。まず直径 8 ミリの円柱状の CCM 合金を造形した。この円柱を 2 ミリ厚の円板状に切断し、試料とした。CCM 結合配列を持つペプチド (CCM 結合ペプチド) はファージディスプレイ法により選択した。選択した CCM 結合ペプチドのアミノ酸配列を調べ、3D-CCM への結合能を評価した。ストレプトアビジンによりラベルした CCM 結合ペプチドの水溶液に 3D-CCM を浸漬し、37°C で 1 時間インキュベートすることで 3D-CCM 表面をペプチド修飾した。ペプチドの結合能は、ビオチン化した HRP との相互作用を利用して検討した。さらに CCM 結合ペプチドに RGD 配列を連結したペプチド (CCM-RGD) を合成し、3D-CCM 表面を修飾した。この表面におけるウシ血管内皮細胞 (CPAE) の接着性を評価した。

【結果と考察】 4 種類の CCM 結合ペプチドを 3D-CCM に適用した。その結果、明らかに高い結合能を示す配列を 1 つ見出した。このペプチドに RGD 配列を連結した CCM-RGD ペプチドを合成し、3D-CCM を修飾した。ここに CPAE を播種したところ、培養 4 時間で 3D-CCM 表面は組織培養用ポリスチレンの表面よりも高い細胞接着性を示した。この傾向は、培養 24 時間後においても同様であった。また、培養液中の血清の有無はこの結果に影響を及ぼさないことも明らかにした。以上から、3D-CCM に特異的に結合する機能性ペプチド配列を見出し、このペプチドを用いた表面修飾が血管内皮細胞の接着性向上に有効である可能性を見出した。



図1 未処理の3D-CCM(上)および CCM-RGD 修飾した 3D-CCM(下)における CPAE 細胞

Surface modification of 3D-printed CCM to improve endothelial cell adhesion using functional peptide

Satoshi Migita¹, Yuta Saito¹, Tomohiko Yamazaki², Suyalatu³

¹Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University

²National Institute for Materials Science (NIMS)

³NTT DATA ENGINEERING SYSTEMS

Tel: +81-238-26-3740, E-mail: migita@yz.yamagata-u.ac.jp

物理架橋ポリビニルアルコールを用いた自己拡張型ハイドロゲルステントの設計

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 東京医科大学消化器内科学分野, ³ 福井大学大学院工学研究科, ⁴ 福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構
○永川 栄泰^{1,3}, 柚木 俊二¹, 糸井 隆夫², 土屋 貴愛², 末 信一郎^{3,4}, 藤田 聡^{3,4}

【緒言】胆管ドレナージに用いられる自己拡張型金属ステントは、長期開存性という長所があるものの再狭窄が生じた際に抜去できず、プラスチックステントは抜去可能であるが早期に閉塞してしまうという課題を抱えている。我々は両者のステントの長所を両立した新規なステントとして、ポリビニルアルコール (PVA) ハイドロゲルの膨潤性を自己拡張性の駆動力へと転換した胆管ステントを着想した。本研究では、円筒状に成型した PVA ハイドロゲルの設計と拡張性評価の結果について報告する。

【実験】重合度 1,700、ケン化度 98.0–99.0 % の PVA (クラレ社製ポパール: PVA-117) を用いた。10 wt% に調製した PVA 水溶液に 2 M の硫酸ナトリウム溶液を滴下し塩析沈殿物を得、凍結融解処理により物理架橋 PVA ゲルを作製した。PVA ゲルの機械的強度は貯蔵弾性率及び引裂強度により評価し、体積膨潤度は 37°C の生理食塩水に浸漬し膨潤時の体積 (V_s) を乾燥時の体積 (V_d) で除すことにより評価した。円筒状に成型した PVA ゲルを延伸倍率 1.0–2.5 倍で乾燥させた。乾燥後の円筒型 PVA ゲルを 37°C の生理食塩水に浸漬し、膨潤後の全長、内径及び外径を計測した。

【結果と考察】乾燥状態での円筒状 PVA はプラスチックステントに類似した屈曲性を有し、膨潤後はゴム様の弾性体へと変化した。体積膨潤度は 3.1 ± 0.1 であり、膨潤後には、全長、内径及び外径のいずれも増加した。乾燥時に延伸しなかった場合は、全長、内径及び外径はそれぞれ約 1.5 倍と相似拡大した (Fig. 1(a))。これに対し、延伸下で乾燥すると、延伸倍率が大きくなるにつれて全長の増加倍率が低下し、一方で、内径および外径の増加倍率が高くなった。2 倍延伸下で乾燥して作製した円筒型 PVA の膨潤前後の外観を Fig. 1(b) に示す。膨潤前後で全長がほぼ変化せず、内径・外径が約 2 倍に増加する円筒型 PVA ゲルが得られ、高い自己拡張性を示した。また、引張試験においても十分な引裂強度を有することも示された。以上の結果から、内径の自己拡張性を有し、クランプによる抜去が可能な“ハイドロゲルステント”の基本コンセプトが示された。

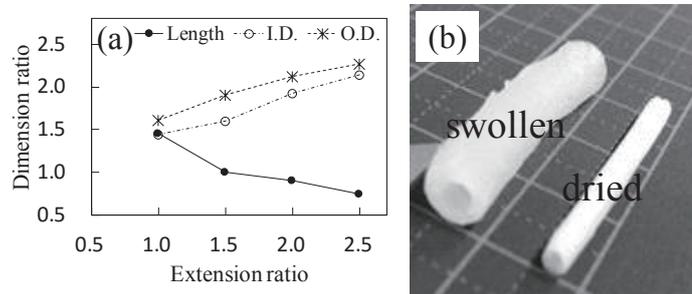


Figure 1. (a) Increase in dimension of dried cylindrical PVA hydrogel. Length, inner (I.D.) and outer diameters (O.D.) were plotted to extension ratio in drying of cylindrical PVA. (b) Appearances before and after swelling.

【謝辞】株式会社クラレより PVA (ポパール) をご提供頂いた。PVA ゲルの構造分析について都産技研の小川大輔研究員の助言を受けた。ここに感謝の意を表す。

Design for self-expandable hydrogel stents by using physically cross-linked poly(vinyl) alcohol

Yoshiyasu Nagakawa^{1,3}, Shunji Yunoki¹, Takao Itoi², Takayoshi Tsuchiya², Shin-ichiro Suye^{3,4}, Satoshi Fujita^{3,4}

¹Biotechnology Group, Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, ²Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical University, ³Graduate School of Engineering, University of Fukui, ⁴Life Science Innovation Center, University of Fukui

Tel: +81-3-5530-2671, Fax: +81-3-5530-2629, E-mail: nagakawa.yoshiyasu@iri-tokyo.jp

超音波噴霧熱分解法による銀担持炭酸カルシウムの調製とその粉体性状

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

○上田 真結¹, 横田 倫啓², 本田 みちよ¹, 大坂 直也³, 牧田 昌士³, 西川 靖俊³, 春日敏宏⁴, 相澤 守¹

【緒言】インプラントを用いた手術では、埋入インプラント表面で細菌がバイオフィルムを形成することにより発症する手術部位感染が問題となっており、耐感染性を備えた生体材料の開発が必要とされている。本研究では、抗菌性無機フィラーの開発を目指し、人工骨補填材などの生体材料の成分として利用されている「炭酸カルシウム」と抗菌剤の「銀」を組み合わせた「銀担持炭酸カルシウム粉体」の調製に着手した。炭酸カルシウムは溶解性が高く、溶出した Ca^{2+} イオンには骨形成を促す働きがある。この複合材料の合成方法として、組成を制御したマイクロサイズの球状粉体を合成することができる「超音波噴霧熱分解法」を利用した。今回は、超音波噴霧熱分解法により銀担持炭酸カルシウム粉体を調製し、その粉体性状を調べたので報告する。

【実験】酢酸カルシウム一水和物水溶液に、銀添加量が 0, 1, 5, 10 mol% となるよう硝酸銀を添加し、これを試料溶液とした。この溶液を 600 °C で超音波噴霧熱分解することにより粉体を調製し、洗浄処理および凍結乾燥を経て、銀担持炭酸カルシウム粉体「 $\text{Ag-CaCO}_3(x)$ 」を得た。なお、カッコ内の x は仕込みの銀添加量 (mol%) を示している。 Ag-CaCO_3 粉体の評価には、粉末 X 線回折 (XRD)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) などを用いた。また、 Ag-CaCO_3 粉体からの Ca^{2+} および Ag^+ イオンの溶出挙動を調査した。浸漬液には 20 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES 緩衝液 (pH = 7.30) を用い、溶出液中の Ca^{2+} イオンおよび Ag^+ イオンの定量には誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-AES) を用いた。次に、黄色ブドウ球菌 (グラム陽性菌) に対する Ag-CaCO_3 粉体の抗菌性評価試験を行なった。試験には Ag-CaCO_3 粉体を LB 培地に浸漬させて得られた溶出液を用い、濁度測定により菌数の測定をした。

【結果と考察】XRD による結晶相の同定より、銀を添加した $\text{Ag-CaCO}_3(1)$ 、 $\text{Ag-CaCO}_3(5)$ 、 $\text{Ag-CaCO}_3(10)$ 粉体はカルサイト型炭酸カルシウムと銀の混合相であることがわかった。また、TEM-EDX による超微細構造の観察および元素分析から、調製した Ag-CaCO_3 粉体は、マイクロメートルサイズの炭酸カルシウム粒子中に、銀がナノメートルサイズの粒子として存在していることが確認された。 Ag-CaCO_3 粉体のイオン溶出試験では、28 日間にわたって粉体から Ca^{2+} イオンおよび Ag^+ イオンが持続的に溶出した。このことから、調製した Ag-CaCO_3 粉体は溶出した Ca^{2+} イオンによる骨形成の促進および溶出した Ag^+ イオンによる抗菌性の発現が期待できる。 Ag-CaCO_3 粉体の溶出液を用いた抗菌性試験では (図 1)、銀を含有しているサンプルが黄色ブドウ球菌の発育を大きく抑制していることが確認され、粉体から溶出した銀イオンによる抗菌性の発現が示された。以上の結果より、調製した銀担持炭酸カルシウム粉体は骨形成を促し、抗菌性も発現するような無機フィラーとして、耐感染性を備えた生体材料への展開が期待できる。

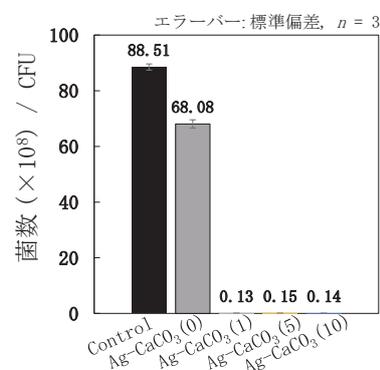


図 1 黄色ブドウ球菌に対する抗菌性試験結果

Preparation of silver-containing calcium carbonate via ultrasonic spray-pyrolysis route and their powder properties

Mayu Ueda¹, Tomohiro Yokota², Michiyo Honda¹, Naoya Osaka³, Masashi Makita³, Yasutoshi Nishikawa³, Toshihiro Kasuga⁴, Mamoru Aizawa¹

¹School of Science and Technology, Meiji University ²Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University ³ORTHOREBIRTH Co. Ltd. ⁴Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

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

アパタイト核処理による導電性 CNT/PEEK 複合材料へのアパタイト形成能付与

¹ 京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻

² 京都大学エネルギー理工学研究所

○石崎千尋¹, 藪塚武史¹, 昼田智子¹, 福島啓斗¹, 高井茂臣¹, 八尾健²

【緒言】

アパタイトは細胞やタンパク質などの生体と親和性が極めて高いことが知られている。アパタイトと他の機能性材料とを微細なスケールで組み合わせることにより、バイオセンサーやチップデバイスなど、細胞をセンサー素子として利用する高機能な小型デバイスの開発が可能であると考えられる。

ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を持つ水溶液である擬似体液 (SBF) の温度および pH を調整すると、均一核形成によりリン酸カルシウムの微粒子 (アパタイト核) が析出する [1]。我々はこれまでの研究で PEEK に硫酸処理、酸素プラズマ処理を行った後に PEEK 表面にアパタイト核を形成させることで、SBF 中でアパタイト核がヒドロキシアパタイトの形成を高活性に誘起し、1 日以内に表面全体がヒドロキシアパタイトで被覆させることを見出した [2, 3]。本研究では、PEEK 母材にカーボンナノチューブを配合し、良好な導電性を付与したカーボンナノチューブ/PEEK 複合材料 (CNT-PEEK) に同様の処理を行うことで CNT-PEEK へのアパタイト形成能付与を試みた。

【実験】

10%のカーボンナノチューブを配合した棒状の CNT-PEEK (直径 1 cm) を 2 mm 幅に切り出し、両面を研磨したものを基板として用いた。その後 98 wt%硫酸を用い、室温で CNT-PEEK の硫酸処理を行った。この基板へ酸素プラズマを 200 W で 4 分間照射し表面の親水性を向上させた。プラズマ照射後の基板を速やかに 25.0°C、pH 8.40 に調整した SBF に浸漬し、70°C で 24 時間保持した。上述の操作によりアパタイト核を析出させた基板を生理的条件 (36.5°C、pH 7.40) に調整した SBF 中に 7 日間浸漬し、アパタイト形成能を評価した。

上記の各過程における基板表面について、電界放出型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM)、エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX)、薄膜 X 線回折測定装置 (TF-XRD)、接触角測定装置を用いて観察および分析を行った。

【結果と考察】

硫酸処理により CNT-PEEK 表面に直径約 500 nm の網目状の細孔が形成された。この基板のプラズマ処理により接触角が 92.4° から 4.7° まで低下したことから基板表面に親水性が付与されたことが確認された。さらに、25.0°C、pH 8.40 に調整した SBF に 70°C で 24 時間浸漬した後の EDX 分析の結果、P と Ca のピークが検出された。このことから基板表面にリン酸カルシウムが析出したと示唆された。また SBF 浸漬 7 日後に表面全体に骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状結晶が SEM により観察された。これにより CNT-PEEK 表面にヒドロキシアパタイトが形成されたことが分かった。

以上の結果より、CNT-PEEK へのアパタイト形成能付与の実現により、CNT-PEEK が有する電気的性質とアパタイトが有する生体適合性の双方を具備する材料の開発が可能であることが分かった。

【参考文献】

- [1] T. Yao, M. Hibino, T. Yabutsuka, US Patent /US8512732 (2013), Japan Patent/5252399(2013).
- [2] T. Yabutsuka et al., Mater. Sci. Eng. C, 81, 349-358(2017).
- [3] T. Yabutsuka et al., J. Biomed. Mater. Res. B, in press.

【謝辞】

本研究の一部は、JSPS 科研費 (16K16401)、村田学術振興財団研究助成、京都大学リサーチ・ディベロップメントプログラム「いしずえ」により遂行した。

Apatite-forming ability of apatite nuclei incorporated carbon nanotube-PEEK composite

○Chihiro ISHIZAKI¹, Takeshi YABUTSUKA¹, Tomoko HIRUTA¹, Keito FUKUSHIMA¹

Shigeomi TAKAI¹, Takeshi YAO²

¹Graduate School of Energy Science, Kyoto University

²Institute of Advanced Energy, Kyoto University

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

第4級アンモニウム基を有するポリマーのグラフト化による PEEK 表面への殺菌性付与

¹東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻, ²国立研究開発法人理化学研究所
○大愛 景子¹, 井上 祐貴¹, 中尾 愛子², 石原 一彦¹

【緒言】 オールプラスチック製医療デバイスは、CT や MRI といった医療機器による診断への干渉を低減する。また、成形加工の際に 3D プリンターとの併用も可能となり、個人に適用できるデバイス形状も容易に実現できる。ここで、スーパーエンジニアリングプラスチックで優れた機械的強度と化学的安定性を持つ poly(ether ether ketone) (PEEK) は、光照射により表面にラジカルを発生するため、フリーラジカル重合によってポリマーグラフト鎖を形成できることを見出した[1]。この自己開始型光グラフト重合により、PEEK 表面に必要な表面特性を付与できる。医療デバイスの設計においては、機械的特性といったバルク特性に加え、生体分子と接触する界面における生体応答を考慮した適切な表面特性が求められる。医療インプラントに関わる生体応答として重篤な問題が、バイオフィーム(BF)が誘発する感染である。BF とは、物質表面に付着した微生物集団とこれが生産する細胞外高分子物質が形成する 3 次元構造体であり、コロニーが崩壊すると大量の細菌が放出される。BF は薬剤や生体免疫の拡散・透過を抑制するために、内部の細菌を死滅させることができない。そこで BF 形成そのものの阻害が求められる。そこで本研究では、表面に殺菌機能を付与した PEEK 材料の創製を目的とした。

【実験】 PEEK 基板を 2-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA)水溶液に浸し、波長 350 ± 50 nm の光を 10 分および 30 分照射することで、表面に poly(DMAEMA) (PDMAEMA) 層を構築した。次いで、 C_4H_9Br あるいは $C_{12}H_{25}Br$ を用いたメンシュトキン反応により、PDMAEMA 層を、第4級アンモニウムカチオン(QA)を有するポリマー層へと改質した。大腸菌を含む菌液を各修飾後基板表面に接触させ、未修飾の PEEK 基板表面に接触させた場合を基準とし、菌液中の大腸菌の生存率を調べた。

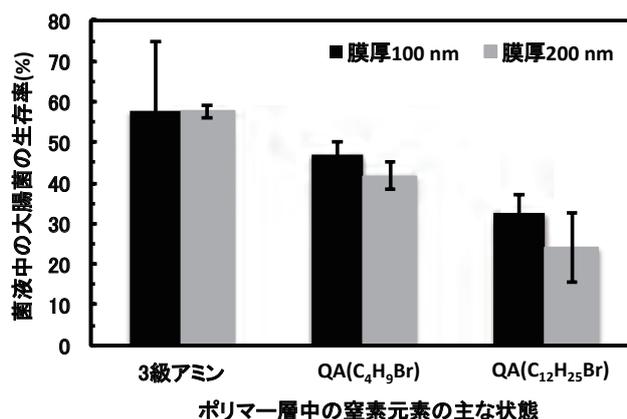


Figure 1 各修飾後基板表面に接触させた菌液中の大腸菌の生存率

【結果と考察】 XPS および ATR-FTIR などの表面解析により、PEEK 表面に PDMAEMA 層が構築されたことを確認した。またメンシュトキン反応後は、表面に QA の存在が確認された。Figure 1 に示すように、PDMAEMA 層の膜厚がより長く、QA 末端の炭素鎖がより長い PEEK 表面が最も高い殺菌性を示した。前者は、重合時間が長くなると、グラフト鎖の膜厚、鎖長のばらつき及び密度が増加するため、大腸菌 1 個あたりが接する QA の数が多くなり、カチオンが細胞膜のアニオン性構成成分を引き抜くという殺菌機構が増強されたためだと考えられる。後者は、ポリマーの疎水部分が細胞膜に貫入することで細胞膜の整合性を阻害する殺菌機構が効果的に機能したためだと考えられる。これらの結果より、PEEK の機械的特性と表面殺菌性を有するポリマーバイオマテリアルの創製が可能となった。

[1] M. Kyomoto *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 537–542 (2009)

本研究は AMED の S-イノベーション革新的医療を実現するためのバイオ機能材料の創製によった。

Antibacterial PEEK with quaternized ammonium via self-initiated surface graft polymerization

Keiko OAI¹, Yuki INOUE¹, Aiko NAKAO², Kazuhiko ISHIHARA¹

¹Department of Materials Engineering, the University of Tokyo

²Institute of Physical and Chemical Research

Tel: +81-3-5841-7128, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: oai@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

ハイドロキシアパタイトと L ポリ乳酸より作製した新規骨接合材の in vivo 骨形成能評価

¹京都大学大学院医学研究科 感覚運動系外科学講座整形外科, ²敷波保夫研究所
 ○森實 一晃¹, 敷波 保夫², 藤林 俊介¹, 後藤 公志¹, 大槻 文悟¹, 河井 利之¹, 清水 孝彬¹, 松田 秀一¹

【緒言】非焼成ハイドロキシアパタイト(HA)と L-ポリ乳酸(PLLA)との鍛造強化材である Super-Fixsorb(SF)は、生体活性吸収性骨接合材として臨床にて広く普及しているが、大きなものは骨との完全置換に10年近く要し、長期残存による皮下触知や異物反応などの問題が残る。本研究は鍛造 PLLA の特徴である靱性と HA との composite に基づく剛性を維持し、かつ生体活性能と吸収能がより向上した骨接合材の開発を目的とする。Control の SF では HA 微粒子は非連続的単純分散であるのに対し、連結した新規分散形態である新規群を開発し in vivo での評価を行ったので報告する。

【実験】HA/PLLA の混合繊維と PLLA のみの単独繊維が交差した不織布を作製し、それらを充填、圧縮、脱気しチョーク様ロッドを作製。これを約 200°C に加熱して PLLA を熔融させ、熔着、冷却固化して緻密体とし、次に 105°C で軟化させ鍛造ロッドを作製した。HA/PLLA の全比率は SF と同様に重量比で HA/PLLA=30/70 とした。ただし、混合繊維内の HA 微粒子は連結している霜降り状の高濃度状態にある。これらと SF で作製したロッドを 32 羽の日本白色家兔の大腿骨遠位骨髄内に埋入し、4、8、12、25 週で力学的・画像学的・組織学的に評価した。

【結果】押し抜き試験・曲げ強度試験では 2 群間で有意な差はなく、曲げ試験では 2 群とも 12 週にわたりヒト皮質骨より高い値を示した。μCT で計測した周囲新生骨の割合は、新規群で高い傾向を示した。組織学的には SF 群に比べ新規群で早期よりロッド周囲及びロッド内への新規骨形成が 8 週より認められ、25 週では有意にロッド断面積の縮小を認めた。

【考察】今回開発した HA/PLLA 骨接合材は早期より周囲骨と顕著な親和性を示し、高い骨との一体化と置換能を有することが示唆された。三次元的に絡み合った HA/PLLA 繊維と PLLA 繊維により、早期から連結層を経由した体液侵入があり PLLA の加水分解と HA 微粒子の生体活性が高まったと考えられ、新規の生体吸収性骨接合材として臨床実用が期待できる。

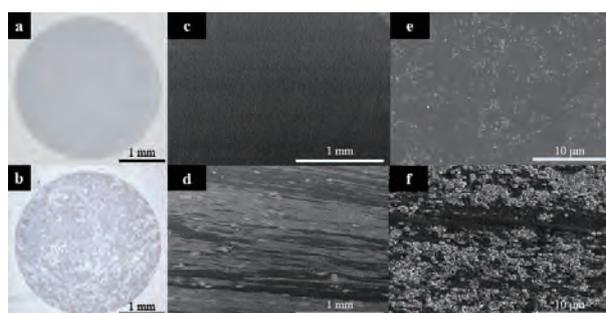


Figure 1. Optical microscope images of (a)SF and (b)new composite, and SEM images of (c,e)SF and (d,f)new composite.

Implantable composite devices of unsintered hydroxyapatite and poly-L-lactide with dispersive marbling morphology to enhance bioactivity and bioresorbability

Kazuaki Morizane¹, Yasuo Shikinami², Shunsuke Fujibayashi¹, Koji Goto¹, Bungo Otsuki¹, Toshiyuki Kawai¹, Takayoshi Shimizu¹, Shuichi Matsuda¹

¹Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

²Shikinami Yasuo Institute

Tel: +81-75-751-3366, Fax: +81-75-751-8409, E-mail: morizane@kuhp.kyoto-u.ac.jp

動的細胞培養を可能とする HAp 複合培養基材の創出と材料評価

¹近畿大学大学院生物理工学研究科, ²大阪歯科大学中央歯学研究所, ³大阪歯科大学口腔外科学第一講座, ⁴株式会社ソフセラ,
○南浦 亮介¹, 本田 義知², 上田 衛³, 小粥 康充⁴, 上向井 徹⁴, 古菌 勉¹

【緒言】骨組織の応力に対する受容体機序を解明する試みはなされているが、その解明は十分ではない。その理由として、一般的な動的細胞培養基材に細胞は伸展するが、骨組織を模倣した基材の開発が途上な点が考えられる。そこで本研究では、骨組織の硬組織成分となるハイドロキシアパタイト (HAp) をナノ粒子化させて透明で伸縮性のある基材にコーティングすることで、動的細胞培養に適した基材を創出した。創出した基材に対して引っ張り試験を実施することで、基材の伸縮が HAp ナノ粒子の表面被覆率に与える影響を評価した。また当該基材上にラット骨芽細胞様細胞株 (UMR106) およびヒト脂肪由来幹細胞 (hADSC) を播種した細胞培養試験を実施した。

【実験】HAp ナノ粒子および Zn-HAp ナノ粒子は湿式法にて合成した。また得られた粒子の分散性向上のため、融着防止処理を施してから仮焼することで、分散性および結晶性に優れる HAp および Zn-HAp ナノ粒子を得た。キャラクタリゼーションとして、XRD および FT-IR を用いた。また Zn-HAp ナノ粒子の Zn 置換率は ICP-OES を用いた。HAp 複合培養基材は、ポリジメチルシロキサン (PDMS) シートにアクリル酸をグラフト重合することで表面に導入したカルボキシル基と、各ナノ粒子の静電的相互作用により結合させることで調製した。調製した培養基材に対する力学的評価としてサーボパルサを用いた引っ張り試験を行った。試験は 1 日および 3 日間行い、試験後の基材を SEM 観察することで試験前後の HAp 表面被覆率を評価した。次に生物学的評価として細胞培養試験を実施した。骨芽細胞は HAp 複合基材上に播種して動的細胞培養を行い、ヒト脂肪由来幹細胞は Zn-HAp 複合基材上に播種して静的細胞培養を行った。基材上に接着した細胞の形態観察は光学顕微鏡を用いて行った。

【結果と考察】XRD 測定より、得られた HAp および Zn-HAp ナノ粒子は HAp の結晶構造を有していることが確認され、FT-IR 測定より、各ナノ粒子は HAp に由来する官能基の吸収が認められた。また ICP-OES 測定より、Zn-HAp は仕込み比の 8 割の Zn イオンの置換が確認された。引っ張り試験の実施前後の培養基材の表面を SEM 観察した結果、HAp ナノ粒子の表面被覆率は、試験前後で大きな差が生じていないことが確認された。HAp を複合した培養基材上に骨芽細胞を播種して動的細胞培養を行った結果、ひずみ方向に対して垂直方向への配向が確認された。この結果より、当該培養基材が動的細胞培養に好適であると同時に、本試験条件は骨芽細胞がメカニカルストレスを感知する強さであることが分かった。また Zn-HAp を複合した培養基材上にヒト脂肪由来幹細胞を播種した結果、Zn 置換率上昇に伴って接着性の向上が確認された。これは Zn 置換に伴う HAp の表面性状の変化や、Zn イオン取り込みの影響が考えられた。以上の結果より、HAp 複合培養基材は動的細胞培養を用いた生物学的評価に有用であることが示唆された。

Development and evaluation of HAp-composite substrates for cell culture

Ryosuke Minamiura¹, Yoshitomo Honda², Mamoru Ueda³, Yasumiti Kogai⁴, Toru Uemukai⁴, Tsutomu Furuzono¹

¹Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University ²Institute of Dental Research, Osaka Dental University ³First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University, ⁴Sofsera Corporation

Tel: +81-0736-77-3888, Ext: 5206, E-mail: furuzono@waka.kindai.ac.jp

血管と骨形成を促進するハイドロゲル構造体の作製

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, ²東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, ³スタンフォード大学整形外科
 ○穴田 貴久^{1,2,3}, 鈴木 治², Yunzhi Yang³

【緒言】

骨欠損の修復において自家骨移植の代替となるバイオマテリアルの開発が求められている。自己再生の難しい大きな骨欠損の場合には、欠損部周辺の血管形成が不十分だと骨修復が遅れたり十分な骨再生が起こらないことが問題である。可視光によるデジタルライトプロセッシング (DLP) は、細胞やタンパク質へのダメージが少なく、生体材料への応用が可能な三次元光造形技術である。本研究は、光架橋性ゼラチン (GelMA) に血管形成を促進するためのスフェロイド化血管内皮細胞及び骨形成を促進するためのリン酸オクタカルシウム (OCP) を混合し DLP によって血管と骨形成を促進することができるハイドロゲル構造体の作製を行った。今回はこのハイドロゲルによる間葉系幹細胞の骨芽細胞分化と血管内皮細胞の血管形成に与える影響について検討した。

【実験】

無水メタクリル酸とゼラチンから光架橋性ゼラチン (GelMA) を合成した。OCP は既報¹)に従って合成し、粒径 53 μm 以下に整粒した。スフェロイド培養デバイスはポリジメチルシロキサン (PDMS) を用い作製したが、既に報告しているもの²)を本研究用に改変して作製した。独自開発の可視光ステレオリソグラフィ (SLA) 装置を用いて三次元 GelMA ハイドロゲル構造体を作製した。ハイドロゲル中に種々の容量で OCP 顆粒を混合し、その上で間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 を播種して骨分化培地で培養し、細胞数と骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性について測定した。また、スフェロイド培養デバイスを用いて調製した血管内皮細胞 (HUVEC) スフェロイドをハイドロゲルに内包し、血管様構造体の形成について観察した。

【結果と考察】

外周にはリン酸カルシウムを含むハイドロゲルを、内周には HUVEC スフェロイドを内包するためのハイドロゲル構造を有する二重円型ハイドロゲルを可視光 DLP によって作製することができた。OCP を含むハイドロゲル上で培養した C3H10T1/2 は OCP を含まないゲルと比較して ALP 活性が上昇しており、OCP 含有ハイドロゲルによって骨芽細胞への分化が促進されることが示唆された。スフェロイド培養デバイスは一度に大量の HUVEC スフェロイドを簡便に作製することができた。培養デバイスから回収したスフェロイドをハイドロゲル中で培養することによりゲル中で管腔形成が観察された。この血管様構造体の長さや数はゲルの硬さに依存した。以上の結果から、スフェロイドを内包した OCP 含有ハイドロゲル構造体は骨欠損部位において血管形成と骨形成を促進する可能性が示唆された。

(参考文献)

1. O. Suzuki, M. Nakamura, Y. Miyasaka, M. Kagayama, M. Sakurai, Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite, *Tohoku J. Exp. Med.* 164 (1991) 37-50.
2. T. Anada, J. Fukuda, Y. Sai, O. Suzuki, An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids, *Biomaterials* 33 (2012) 8430-8441.

Fabrication of 3D hydrogel constructs to promote vascularization and bone formation

Takahisa Anada^{1,2,3}, Osamu Suzuki², Yunzhi Yang³

¹Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, ²Tohoku University Graduate School of Dentistry, ³Department of Orthopedic Surgery, Stanford University School of medicine
 Tel, Fax: +81-92-802-6238, , E-mail: takahisa_anada@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

ナノ構造析出純チタン金属表面へのアメロジェニンコーティングが歯髓細胞に与える効果

¹大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座, ²大阪歯科大学医療保健学部

○高尾誠二¹, 小正 聡¹, 西崎真理子¹, 寺田知里¹, 波床真依¹, 楠本哲次¹, 吉峰茂樹¹, 西崎宏², 小正 裕², 岡崎定司¹

【緒言】我々は純チタン金属表面にアルカリ処理を行うことで、チタニアナノシート構造（以下、TNS）を析出させ、骨髄細胞の初期接着に有用であることを明らかにした。また、歯周組織の再生方法の一つであるエムドゲインの主要タンパク質であるアメロジェニンをスピコート法により TNS にコーティングすることで、ラット骨髄細胞および歯根膜細胞の初期接着ならびに硬組織分化誘導能に大きな影響を与えると共に、*in vivo* レベルにおいてもインプラント埋入周囲組織に新生骨が形成されることが明らかとなった。一般的に歯髓細胞は様々な再生医療に利用できることが明らかで、紫外線など外来刺激を受けないので、再生医療のために保存する細胞として理想的であるといえる。アメロジェニンが歯髓細胞を硬組織に分化誘導することができれば、硬組織ならびに軟組織を同時再生することのできる新たなインプラント材料の開発が可能となる。本実験はナノ構造を析出した純チタン金属表面へコーティングされたアメロジェニンが歯髓細胞の硬組織分化誘導能にどのような影響を与えるのか、これまでの研究業績も併せて報告する。

【実験】実験材料として市販の JIS2 級純チタン金属板を使用し、表面に濃アルカリ処理によりナノ構造を析出させアメロジェニンをスピコート法によりコーティングしたものを実験群、TNS のみ析出させたものを対照群として使用した。試料の表面構造は SPM にて観察した。試料表面における元素分析を XPS にて行った。各試料表面における元素の結合状態を FTIR にて解析した。次に、生後 7 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から骨髄間葉細胞を採取し、ラット歯根膜細胞は Lonza より購入し、SCGM (BulletKit: Stromal cell growth medium, lonza) を用いて継代培養を行い、歯髓細胞は歯髓細胞バンクより享受し、3 代目を実験に供した。各々の細胞を実験群および対照群の材料群に播種し、培養開始 1, 3, 6, 24 時間の各群における細胞接着数の比較、培養後 14, 21 日後の ALP 活性および 21 日後のオステオカルシンの産生量およびカルシウムの析出量を測定した。統計学的解析には、各測定値に Student の t 検定を行った。有意水準は 5%とした。

【結果と考察】SEM および SPM による観察結果では、実験群ではアメロジェニンと推察される構造が示された。XPS および FTIR では、実験群で TNS 構造にタンパク質のコーティングを認めアメロジェニンがコーティングされていることが明らかとなった。各種細胞を使用した *in vitro* 評価では全ての計測時間において実験群で細胞接着、ALP 活性、オステオカルシン産生量、カルシウム析出量が有意に高い値を示した。

以上の結果により、濃アルカリ処理を施した純チタン金属表面へのアメロジェニンのコーティングが *in vitro* レベルで歯髓細胞の硬組織分化誘導能の向上に強い影響を与えると共に、インプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導に大きな影響を与えることを明らかにした。また、骨髄細胞、歯根膜細胞に与える影響と併せてもこの新規材料は硬組織および軟組織を同時再生できる材料として期待できる。

Effect of amelogenin coating nano-modified titanium on dental pulp cells

Seiji Takao¹, Satoshi Komasa¹, Mariko Nishizaki¹, Chisato Terada², Mai Hatoko¹, Tetsuji Kusumoto², Shigeki Yoshimine¹, Hiroshi Nishizaki², Yutaka Komasa², Joji Okazaki¹

¹Department of Removable Prosthodontics and Occlusion, Osaka Dental University

² Faculty of Health Sciences Oral Health Engineering, Osaka Dental University

Tel: +81-6-6910-1043, Fax: +81-6-6910-4519, E-mail: takao-s@cc.osaka-dent.ac.jp

α 型リン酸三カルシウム球の硬化による低結晶性 ハイドロキシアパタイト多孔体の作製

¹九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座生体材料学分野

○岸田 良¹, Tya Indah Arifta¹, 石川 邦夫¹

【緒言】骨補填材の生体吸収性を向上させるためには細胞連通性の付与が有効であり、そのために材料への多孔質構造の導入が有望視されている。カルシウム欠損型ハイドロキシアパタイト (cdHAp; $\text{CaHPO}_4(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) は骨に近似した組成・結晶化度 (低結晶性) を有するが、高温で不安定のため焼結することができず、気孔形成材を用いた多孔体化が不可能である。cdHAp を得る方法としては、 α 型リン酸三カルシウム (α -TCP) を水和させる硬化反応が知られている。これまでに、我々は α -TCP フォーム顆粒の溶解析出を利用して cdHAp 多孔体を作製することに成功してきたが、機械的強度に問題点があった。顆粒連結多孔体の強度を改善するためには、顆粒の緻密化および顆粒間面接触の導入が有効である。そこで我々は緻密な α -TCP 微小球を調製し、それらを密に充填させた前駆体形状を準備することで、溶解析出により変換された cdHAp 球を連結させた高強度の多孔体を作製する方法を検討した。

【実験】Water-in-oil (W/O) エマルジョン法により調製した α -TCP 球 (粒径 300-600 μm) を型に充填し、少量の水を加えて加圧 (0, 10, 20, 30 MPa) することで前駆体形状を準備した。硬化反応を完了させるために、100°Cの水蒸気と 12 時間接触させる方法と 100 °Cの蒸留水に 12 時間浸漬させる方法を検討した。硬化反応の完了を粉末 X 線回折法 (XRD) により確認し、得られた硬化体の構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) および X 線マイクロ CT (μ -CT) で調べた。また、硬化体の機械的強度として間接引張強さ (DTS) を測定した。さらに骨吸収性および新生骨形成を調べるために、兎大腿骨に骨欠損を形成し、得られた多孔体を埋入し 1, 3 ヶ月経過後、病理組織学的検索 (ヘマトキシリン・エオジン染色を行う) による解析を行った。

【結果と考察】全ての系において、12 時間の反応時間で α -TCP 由来の XRD 回折ピークが完全に消失し、ハイドロキシアパタイト由来のピークの出現が確認された。水蒸気に接触させた硬化体には多孔質構造が認められたのに対し、水に浸漬させた硬化体は緻密化が進行し多孔質構造が失われていた。加圧を行わず (0 MPa) に成形した系では球間に連結が得られず、10 MPa 加圧系は容易に崩壊し DTS が測定不能であった。SEM 像および μ -CT 像からは 20, 30 MPa 加圧系の多孔質構造および球間の連結が確認され、ともに DTS が 1 MPa を超える強度を示した。この強度は、これまでに α -TCP フォーム顆粒を用いて作製されていた cdHAp 多孔体の強度を大きく上回る値である。30 MPa 加圧系の SEM 像からは球に生じたクラッキングが確認されたため、付与する圧力の限界が示唆された。20 MPa 加圧により成形した多孔体を埋入した組織標本からは、試料埋入から 1 ヶ月の時点ですでに部分的な骨吸収および新生骨形成が見られ (Figure 1)、3 ヶ月の時点では緩慢な反応の進行が見られた。本研究の結果より多孔体形成において、硬化反応のための水和環境および α -TCP 球の充填形状を精密に制御する必要性が示された。前者の条件は球同士の間生成する cdHAp の架橋の長さに影響し、後者の条件は球間の距離に影響すると考えられ、これらを最適化することの重要性が理解された。

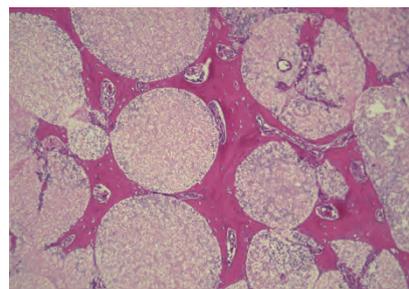


Figure 1 cdHAp 多孔体 (20 MPa 加圧により成形) 埋入から 1 ヶ月後の組織標本

Porous calcium-deficient hydroxyapatite from the setting reaction of α -tricalcium phosphate spherical granules: evaluation of microstructure, mechanical strength, and new bone formation

Ryo Kishida¹, Tya Indah Arifta¹, Kunio Ishikawa¹

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

Tel: +81-92-642-6436, Fax: +81-92-642-6345, E-mail: kishida@dent.kyushu-u.ac.jp

ポリロタキサンの分子可動性調節と成長因子導入による血管ネットワーク形成の促進

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
○兵頭克弥^{1,2}, 有坂慶紀², 山口 聡¹, 依田哲也¹, 由井伸彦²

【緒言】 ポリロタキサン(PRX)は、環状糖分子(e.g. シクロデキストリン)の空洞部に線状高分子(e.g. ポリエチレングリコール)が貫通した超分子構造体であり、環状糖分子が線状高分子鎖に沿って可動する分子可動性が期待される。これまでに当研究室では、この PRX を被膜した細胞培養表面を構築し、低分子量 GTPase である Rho ファミリーの活性化制御に成功している[1]。さらに近年、環状糖分子部位に硫酸基を導入した PRX(硫酸化 PRX)表面にヘパリン結合性成長因子である骨形成因子(BMP-2)を表面導入することが可能となり、PRX 表面の分子可動性調節と成長因子の表面導入によって骨芽前駆細胞の骨芽細胞分化を強力に促進できることを報告している[2]。そこで本研究では、血管内皮細胞のネットワーク化を促すために新たに成長因子を導入した分子可動性 PRX 表面を設計した。血管内皮細胞のネットワーク化には血管内皮細胞成長因子(VEGF)による RhoA の活性化が寄与していることが知られており[3]、PRX 表面の分子可動性調節と VEGF の表面導入によって相乗的な RhoA の活性化が期待できる。今回、分子可動性の異なる硫酸化 PRX 基板に VEGF を表面導入し、分子可動性調節と成長因子の表面導入がヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)のネットワーク化に与える影響について報告する。

【実験】 硫酸化 PRX 表面を作製するために、硫酸化 PRX トリブロック共重合体を合成した。 α -CD と PEG からなる PRX の両末端にアンカーリング部位としてポリベンジルメタクリレート(PBzMA)を配した PRX トリブロック共重合体を合成した。この PRX トリブロック共重合体の α -CD 部位を硫酸化した後、ポリスチレン製基材表面に被膜することで硫酸化 PRX 表面を作製した。この表面に VEGF 溶液を加え、静電的相互作用を介して VEGF の表面導入を行った。細胞の形態や増殖を経時的に顕微鏡観察し、転写共役因子 YAP の細胞内局在評価、RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った。

【結果と考察】 硫酸化 PRX 表面を用いて HUVEC の細胞培養を行ったところ、 α -CD 貫通数の多い PRX 表面(低分子可動性表面)は HUVEC の細胞増殖を促進し、 α -CD 貫通数の少ない PRX 表面(高分子可動性表面)はその増殖を抑制した。また低分子可動性 PRX 表面は、RhoA 活性化によって惹起される YAP の細胞核移行を促進する傾向があった。これらの結果より、低分子可動性 PRX 表面は血管内皮細胞の増殖および RhoA 活性化に有利な表面であることが示唆される。さらにこの低分子可動性 PRX 基材に VEGF を表面導入したところ、遊離の VEGF を添加した群と比較して血管内皮細胞接着分子(PECAM-1)や血小板由来増殖因子(PDGF)の遺伝子発現量が増加し、HUVEC が長く連なったネットワーク構造の形成が促された。一方で、VEGF を表面導入した高分子可動性 PRX 表面は HUVEC のネットワーク構造の形成が抑制された。これらの結果は、PRX 表面の低分子可動性と VEGF の表面導入による相乗的な RhoA の活性化が血管内皮細胞のネットワーク化を効果的に促進したことを示唆している。

【参考文献】 [1] J. H. Seo, S. Kakinoki, T. Yamaoka, N. Yui, *Adv. Healthcare Mater.*, **2015**, 4(2), 215. [2] Y. Arisaka, N. Yui, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **2017**, 28(10-12), 974-985. [3] M. Ohgushi, M. Minaguchi, Y. Sasai, *Cell Stem Cell.*, **2015**, 17(4), 448-61.

Enhancement of vascular network formation by modulating molecular mobility of polyrotaxane and immobilizing growth factors

Katsuya HYODO^{1,2}, Yoshinori ARISAKA², Satoshi YAMAGUCHI¹, Tetsuya YODA¹, Nobuhiko YUI²

¹Department of Maxillofacial Surgery, 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:+81-3-5803-5500, Fax:+81-3-5803-5500, E-mail:k-hyodo.mfs@tmd.ac.jp

純チタン金属表面上に析出させたナノ構造がインプラント埋入周囲歯周組織に与える影響

¹大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座, ²大阪大学産業科学研究所先端ハード材料研究分野
 ○Zeng Yuhao¹, 小正 聡¹, Yin Derong¹, Chen Luyuan¹, 吉峰茂樹¹, 関野 徹², 岡崎定司¹

【緒言】近年, 材料のナノ化や様々な形態を利用し, 従来にない新しい機能を見出そうとする研究が盛んに進められている. 共同研究者により, 室温での濃アルカリ溶液中反応において純チタン金属表面から酸化チタンナノシート (TNS) が直接形成することが見出された. このような低次元ナノ構造体は, 生体適合性材料への応用展開が期待される. 顎骨内に埋入されたインプラントが良好な状態を維持するためには, インプラント体への早期機能負担および長期的咬合支持が重要となる. そのためには, オッセオインテグレーション獲得までの期間は早期であることが望ましい. オッセオインテグレーションの獲得期間短縮にはインプラント体の表面性状が関与し, その構造は細胞接着・硬組織への分化誘導に影響を与えるという報告がある. 本研究では, 純チタン金属を 10M の水酸化ナトリウム水溶液に室温・大気開放圧力下で 24 時間攪拌・浸漬することで表面に TNS 構造を析出させ, インプラント埋入周囲組織にどのような影響を与えるのか *in vitro* および *in vivo* 評価を行ったところ興味ある知見を得られたので報告する.

【実験】実験材料として #2000 まで研磨した市販の純チタン金属表面、純チタン QCM センサおよび純チタンスクリーを使用し, 実験群として TNS を析出させたものを, 対照群として研磨した純チタンを使用した. TNS の析出には, 各試料を 10 M の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し, 攪拌した状態で室温・大気圧条件下で 24 時間反応させた. その後, 試料を取り出し, イオン交換水にて導電率が 5 μ S 以下になるまで洗浄を行った. その後, 自然乾燥させ, 各種材料表面に TNS を析出させた. 試料表面の表面構造を SEM, SPM にて観察、表面の元素分析を XPS にて行った. また、各群表面の蒸留水の接触角を接触式表面形状システム (TalysurfPGI1240) にて測定した. 生後 7 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から骨髄間葉細胞を採取後, 3 代目を実験に供した. 培養開始 1, 3, 6, 24 時間の各群における細胞接着数の比較、培養後 14, 21 日後の ALP 活性および 21 日後のオステオカルシンの産生量およびカルシウムの析出量および各種硬組織分化誘導に関する遺伝子マーカーを測定した. また, 培養開始 1, 3, 6, 24 時間後のウシ血清アルブミンの吸着量について比較・検討した. 実験群および対照群の純チタン金属スクリーを生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの大腿骨に埋入後, 4 および 8 週間生育したのち安楽死させ, 大腿骨を摘出後、Micro-CT により CT 画像を撮影した. CT 画像をソフトウェアにて解析し, BV/TV, Tb. N, Tb. Sp, Tb. Th を算出した. 各測定値は Student の t 検定により統計解析を行い, 有意水準は 5%とした.

【結果と考察】SEM 分析および SPM の所見では, 対照群で滑らかな像が観察されるのに対し, アルカリ処理を施した実験群ではナノレベルのネットワークノジュール構造が観察された. XPS の解析では, 実験群で深い酸化膜の層を形成し, C1s のピークが下がっていることが明らかとなった. 全ての計測時間で細胞接着, ALP 活性, オステオカルシン産生量, カルシウム析出量, Runx2 mRNA の発現が有意に高い値を示した. CT 画像の観察をしたところ, 4, 8 週間共に実験群で海綿骨内の新生骨の著しい形成を認めた. ソフトウェアによる解析結果では, 埋入後 4 週で対照群と比較して実験群で BV/TV および Tb. Th の有意に高い値を示し, 埋入後 8 週ではすべての指標において実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した. これは表面解析の結果より示した実験群材料表面における C1s ピークの減少に起因すると推察される.

以上の結果により, 濃アルカリ処理を施した純チタン金属表面が *in vitro* および *in vivo* レベルでインプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導に大きな影響を与えることを明らかにした.

Influence of alkali-modified titanium surface on implant surrounding tissue

Zeng Yuhao¹, Satoshi Komasa¹, Yin Derong¹, Chen Luyuan¹, Shigeki Yoshimine¹, Tohru Sekino², Joji Okazaki¹

1Department of Removable Prosthodontics and Occlusion, Osaka Dental University

2 ISIR-SANKEN, Osaka University

Tel: +81-070-1789-2017, Fax: +81-864-3134, E-mail: zeng-y@cc.osaka-dent.ac.jp

1 真空熱処理エピガロカテキンガレート結合ゼラチンの生体内分解挙動と 2 細胞接着性の解明

3
4 ¹大阪歯科大学口腔インプラント学講座、²大阪歯科大学中央歯科研究所、
5 ³京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル学講座

6 ○黄 安祺¹、本田 義知²、高 蓓媛¹、田中 知成³、馬場 俊輔¹
7
8

9 【緒言】インプラント治療の成否に繋がる骨欠損治療に向け、優れた骨補填材の開発が精力的に
10 行われている。一方、緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) は、*in vitro* において
11 は種々の間葉系前駆細胞に対し優れた骨芽細胞分化能を示す事が報告されていたものの、*in vivo*
12 での骨形成応用法は未だ確立されていない。近年演者らは、EGCG をゼラチンに化学結合させた
13 スポンジ状材料 (EGCG-GS) およびその真空加熱物 (vhEGCG-GS) を開発し、vhEGCG-GS が
14 優れた骨再生能を示す事を報告した。しかし、その生体内挙動の詳細な解明には至っていない。
15 本研究は、vhEGCG-GS の骨形成機序解明の一端として、ラット頭蓋臨界骨欠損モデルと免疫組
16 織学的評価を用いて、同スポンジの生体内分解挙動の解明を試みたので報告する。
17

18 【実験】EGCG-GS は、豚皮膚由来タイプ A ゼラチンと EGCG を用い水中合成法で作製し、そ
19 の後 150 度 24 時間真空熱処理を施し、vhEGCG-GS を得た。また、機序解明のためゼラチン単体
20 (以下 GS)、真空熱処理を施した GS (以下 vhGS) を作製し用いた。材料学的評価には、走査型
21 電子顕微鏡およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いた。各材料の骨形成能は、8 週齢の SD 系
22 雄性ラットの頭蓋冠に形成した直径 9 mm の臨界骨欠損に、試料を埋入し評価した (実験群)。
23 また非埋入群を対照群とした。埋入 1、4 週間後、頭蓋冠を採取し、免疫組織学的評価を行い、
24 残留ゼラチン量及び、ゼラチンの分解に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ (以下 MMP) -
25 2、-9 の発現挙動を半定量的に評価した。各群 4 匹で実験を行った。また、*In vitro* においてリコ
26 ンビナント MMP-2、-9 を用いた各材料の分解実験を行った。更に上記材料上における骨芽細胞
27 様細胞株 UMR-106 の細胞増殖挙動を評価した。統計学的評価には、一元配置分散分析と Tukey
28 法を用いた。
29

30 【結果と考察】vhGS で最も強い炎症及び MMP-2、-9 の発現が認められた。
31 EGCG-GS、vhEGCG-GS では炎症が軽減するとともに、MMP-2、-9 の
32 染色強度が下がった。vhEGCG-GS が最も緩やかな分解挙動を示した。細胞
33 培養実験の結果、vhEGCG-GS において有意な細胞増殖が認められた。
34 EGCG は MMP の機能を阻害し、真空加熱はゼラチン間に熱架橋を施
35 しゼラチンスポンジの頑健性を高める事が知られている。また、緩や
36 かな担体分解挙動は細胞に足場を提供することが知られている。これ
37 らの知見と、本研究の MMP 群の生体内発現挙動、*In vitro* での分解実
38 験、細胞培養実験の結果を考慮すると、vhEGCG-GS の緩やかな分解挙
39 動は、EGCG の存在と、真空熱処理による熱架橋の総合的な効果であ
40 り、同分解挙動は、vhEGCG-GS の骨形成を向上させる一助となってい
41 る可能性が示唆された。
42
43
44

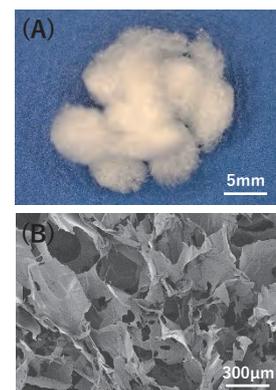


Figure1:真空熱処理カテキンゼラチンスポンジマクロ画像(A)、走査型電子顕微鏡画像(B)

45 Evaluation of biodegradation mechanism and cell adhesion on vacuum heated epigallocatechin gallate- 46 modified gelatin sponge

47 Anqi Huang¹, Yoshitomo Honda², Beiyuan Gao¹, Tomonari Tanaka³, Shunsuke Baba¹

48 ¹Department of Oral Implantology, Osaka Dental University ² Institute of Dental Research, Osaka Dental
49 University ³ Department of Biobased Materials Science, Kyoto Institute of Technology

50 Tel: +81-72-864-3040, E-mail: huanganqid@ gmail.com

プロタミン担持リン酸カルシウムを用いた新規知覚過敏抑制材の開発

¹ 明治大学理工学部, ² 鶴見大学歯学部, ³ マルハニチロ株式会社

○藤木 政志¹, 早川 徹², 山本 雄嗣², 小泉 大輔³, 外川 理絵³, 庵原 啓司³, 相澤 守¹, 本田 みちよ¹

【緒言】 歯周病や加齢による歯肉の退縮で露出した歯根象牙質は、口腔内の pH の低下によって表面成分が溶解し、象牙細管の開口を引き起こす。この象牙細管の開口部に刺激が伝わることにより、象牙質知覚過敏症 (知覚過敏) が発症する。現行の知覚過敏の治療材には、象牙細管を物理的に封鎖するリン酸カルシウム系材料が用いられており、知覚過敏の抑制効果を示している。一方、象牙質はエナメル質より耐酸性が低いため、う蝕原生菌による脱灰、いわゆるう蝕になりやすい。しかし、現行の治療材にはう蝕を防ぐための抗菌効果は備わっていない。そこで本研究では、リン酸カルシウムを用いた象牙細管封鎖材料に抗菌性を付与することにより、知覚過敏の抑制効果とともに抗菌効果も発現することができる新規歯科材料の創製を試みた。なお、抗菌性の付与には、抗菌性タンパク質であるサケ白子由来プロタミン (マルハニチロ株式会社) を用いた。本発表では、プロタミンを担持したリン酸カルシウム粉体の材料特性および、代表的なう蝕原生菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する抗菌性評価を実施した結果について報告する。

【実験】 プロタミン溶液 (1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) 45 cm^3 と湿式粉碎を施した無水リン酸水素カルシウム (DCPA) 粉体 1.5 g を 50 cm^3 チューブに加え、48 h 攪拌することにより、DCPA 粉体にプロタミンを担持した。なお、DCPA 粉体に担持したプロタミン量は HPLC によって測定した。また、材料の特性評価として、ナノ粒子径粒度分布測定装置による粒度分布の測定及びメジアン径の算出およびゼータ電位測定システムによる材料の表面電位の測定を実施した。一方、抗菌性の評価に関しては、コロニーカウント法による菌数の測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) による細菌の観察、LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit による細菌の生死判定を実施した。具体的には、プロタミン溶液の *S. mutans* に対する抗菌性は、プロタミン (0, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) 含有培地中で *S. mutans* を 18 h 培養することで評価した。また、プロタミン担持 DCPA 粉体の表面における抗菌性の評価には、粉体を加圧成形して作製したディスク (直径 15 mm, 高さ 2 mm 程度) を用いた。24 well plate に設置したディスク上に *S. mutans* を播種し、6 h 培養した後、ディスクの表面に付着した *S. mutans* を SEM で観察した。さらに、培養液上清中の *S. mutans* を LIVE/DEAD 試薬で染色した後、蛍光顕微鏡で観察し、細菌の生死判定を実施した。

【結果と考察】 プロタミンを担持した DCPA 粉体には 6.7 mg/g のプロタミンが担持されていた。一方、プロタミン担持 DCPA 粉体のメジアン径は約 1.6 μm であり、開口した象牙細管に入り込むことが可能なサイズであることがわかった。また、DCPA 粉体の表面電位はプロタミンの担持量に伴い増加していた。続いて、プロタミン溶液の *S. mutans* に対する抗菌性の評価を行ったところ、プロタミン濃度依存的に菌数は減少し、処理濃度 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ では 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ に対して菌数が 1% 以下にまで減少した。さらに、ディスク上で *S. mutans* を培養し、その表面を SEM により観察した結果、プロタミン担持 DCPA ディスク上では、プロタミンを担持していない DCPA ディスクに比べ、接着した細菌数が減少していた。また、培養液上清中の細菌を LIVE/DEAD 試薬で染色し、観察したところ、プロタミン担持ディスクとともに培養した場合には死菌数が増加した。これは、ディスクから溶出したプロタミンが *S. mutans* に対し、抗菌性を発現した結果であると考えられる。以上の結果より、本研究で作製したプロタミン担持 DCPA 粉体は、開口した象牙細管を封鎖するとともに、担持したプロタミンにより材料表面および周辺環境において *S. mutans* に対して抗菌効果を発現する新規歯科材料として有用であることが示された。

Development of novel hypersensitivity inhibitor using protamine-loaded calcium phosphate

Masashi FUJIKI¹, Tohru HAYAKAWA², Takatsugu YAMAMOTO², Daisuke KOIZUMI³, Rie TOGAWA³, Keishi IOHARA³, Mamoru AIZAWA¹, Michiyo HONDA¹

¹ School of Science and Technology, Meiji University, ² Department of Dental Engineering, Tsurumi University School of Dental Medicine, ³ Maruha Nichiro Corporation

Tel: +81-44-934-7210, Fax: +81-44-934-7906, E-mail: michiyoh@meiji.ac.jp

歯槽骨再生を目指した硫酸化ポリロタキサン/骨形成因子複合体の骨誘導能評価

¹ 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 有機生体材料学分野, ² 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 顎顔面外科学分野

○寺内 正彦^{1,2}, 田村 篤志¹, 山口 聡², 由井 伸彦¹

【緒言】近年、エナメルマトリックスデリバティブを主成分としたエムドゲインや、b-FGF が配合されたリグロスなど歯槽骨再生を目的として臨床応用されているが、これらは限局した歯槽骨欠損が適応であり、広範な歯槽骨再生を必要とする症例では自家骨移植に頼らざるをえない。一方で、BMP-2 が有する強力な骨誘導能に期待した骨再生療法の検討が以前から行われているが、生理的条件下での速やかな失活、多量投与による副作用の懸念から臨床応用への課題は多く存在する。当研究室では、これらの課題を改善すべく、超分子ポリロタキサン (PRX) を用いた骨再生療法へのアプローチを進めている。PRX は α -Cyclodextrin (α -CD) に Poly(ethylene glycol) (PEG) が貫通したネックレス構造を有しており、 α -CD は非共有結合的に軸上に束縛されているため、軸に沿った可動性を示す。この α -CD の可動性が分子間相互作用における立体障害を改善することで、タンパク質との結合乗数を亢進することを報告してきた (*J. Am. Chem. Soc.* 125, 13016-13017, 2003.)。BMP-2 と静電複合体を形成するために、 α -CD 部位に硫酸基を修飾した硫酸化 PRX (S-PRX) を合成し、*In vitro* 試験での骨分化誘導能を評価してきた。その結果、S-PRX はその硫酸基の修飾数に関わらず、優位な骨分化誘導能を認めた (*Macromol. Biosci.* 15, 953-964, 2015.)。本報告では、S-PRX と BMP-2 の静電複合体が有する骨分化誘導能に関して、S-PRX を形成する PEG 分子量間での比較検討を行った。

【実験】分子量: 2,200 (2k), 4,550 (5k), 9,810 (10k) の 3 種類の PEG に対し、 α -CD 貫通率や硫酸基の修飾率をほぼ一定とした S-PRX を合成した (*J. Biomed. Mater. Res. A.* 105, 1355-1363, 2017.)。In vitro 評価として、マウス由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を BMP-2、ヘパリン/BMP-2 複合体及び、各 S-PRX/BMP-2 複合体にて処理し、骨分化マーカーである Alkaline phosphatase (ALP) 活性能、骨分化関連遺伝子発現量 (Runx2, osterix) 及び、Alizarin red 染色にて評価した。In vivo 試験では、5 週齢・雄の ICR マウス頭頂骨上に直径 3.5mm に生検用パンチにて頭蓋骨欠損モデルを作製し、S-PRX/BMP-2 複合体溶液を浸したアテロコラーゲンスポンジを欠損部に埋入し、マイクロ X 線 CT 測定及び、Hematoxylin-Eosin 染色にて骨形成量を評価した。

【結果と考察】各サンプル処理 3 日後の ALP 活性を評価したところ、PEG 分子量に関わらず、S-PRX 複合体はヘパリン/BMP-2 複合体よりも優位な活性を認めた。処理 7 日目での Runx2 及び、osterix 遺伝子発現量は 2k-S-PRX/BMP-2 が最も高い値を示した。さらには、Alizarin red 染色においても 2k-S-PRX/BMP-2 複合体で処理した細胞は、14 日目からの石灰化を認めたが他群では染色を確認されなかった。よって、*in vitro* においては軸分子量の小さい PEG を用いた S-PRX が骨分化促進に有効であると言える。一方、*in vivo* では、各 S-PRX/BMP-2 複合体を移植した頭蓋骨欠損マウスは、術後 4 週でヘパリン/BMP-2 複合体及び BMP-2 単体を移植したマウスよりも優位な骨形成能を示した。これらは分子量に関わらず、すべての S-PRX/BMP-2 複合体に優位な骨様組織の形成を認め、Hematoxylin-Eosin 染色においては既存骨と新生骨の骨癒合を認めるだけでなく、新生骨内に骨髓様組織の形成が確認された。以上の結果から、S-PRX は PEG 分子量に関わらず、BMP-2 の骨誘導能を増強する有望な高分子材料として期待される。

Polyelectrolyte complex of BMP-2 with sulfonated polyrotaxane for enhancing bone regeneration

Masahiko Terauchi^{1,2}, Atsushi Tamura¹, Satoshi Yamaguchi², Nobuhiko Yui¹

¹Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University ²Department of Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

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

過酸化水素処理によるチタン表面ナノ構造の制御

¹河南科技大学材料科学与工程学院, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, ³岡山大学工学部
○Yaming Wang¹, 岡田 正弘², 矢部 淳², Guangxin Wang¹, 尾坂 明義^{1,3}, 松本 卓也²

【Introduction】 Numbers of surface treatment have been developed to enhance the biocompatibility of titanium implants. Among them, the H₂O₂ oxidation treatment is simple and can form titania gel on the titanium surfaces.¹⁾ From a surface engineering point of view, the H₂O₂ oxidation treatment can also induce the formation of nanostructured surfaces on titanium. However, the effect of H₂O₂ oxidation treatment conditions on the surface nanostructure of titanium remained unknown.

Herein, we report the effects of H₂O₂ oxidation treatment conditions (*i.e.*, temperature and solution composition) on the surface nanostructure of commercially pure titanium (CP-Ti).

【Materials and Methods】 Cp-Ti films (20 μm in thickness) were washed three times with acetone followed with pure water in an ultrasonic bath for 5 min. The CP-Ti films were immersed in a 3 mass% H₂O₂ solution in a pressure-resistant vessel, heated at 80–150°C for 1 h, and then thermally treated at 400°C for 1 h in the air. In order to dope several kinds of cations, 3 mass% H₂O₂ solutions containing 100 mM chloride salts were also used for the oxidation treatments. The surface was observed by using a scanning electron microscope (SEM). The crystal phases were determined from X-ray diffraction (XRD) patterns.

【Results and Discussion】 Figure 1 shows SEM photographs of the CP-Ti surfaces after the H₂O₂ oxidation treatments at different conditions (before thermal treatment at 400°C). A honeycomb-like nanostructure was formed at above 100°C, and the cell size of the honeycomb-like nanostructure increased by increasing the treatment temperature (Figure 1a), which should be due to the elevated dissolution–precipitation process. Note that there was no significant changes in each nanostructure after calcination at 400°C, and amorphous titania transformed into crystalline anatase after calcination.

The surface nanostructure was also changed significantly in the presence of chloride salts (Figure 1b). At the same treatment temperature (120°C), small mesh-like structure was formed after the treatment, and the mesh size was the smallest in the case of CaCl₂. The dissolution behavior of titanium in H₂O₂ solution is influenced by the type of chloride salts²⁾ and the dissolution–precipitation process prevented in the presence of chloride ions.

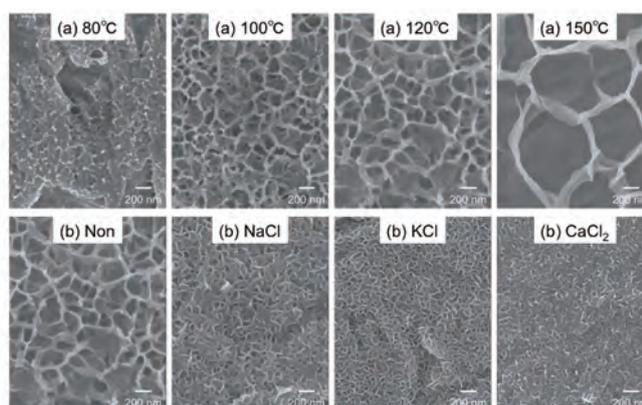


Figure 1. SEM photographs of the CP-Ti surfaces after the oxidation treatments using 3 mass% H₂O₂: (a) without chloride salts at different temperature; (b) with 100 mM chloride salts at 120°C

【References】

- 1) X.X. Wang, S. Hayakawa, K. Tsuru, A. Osaka, J. Biomed. Mater. Res., 2001; 54: 172-8.
- 2) C. Ohtsuki, H. Iida, S. Hayakawa, A. Osaka, J. Biomed. Mater. Res., 1997; 35: 39-47.

Control of surface nanostructure on titanium by H₂O₂ oxidation treatment

Yaming Wang¹, Masahiro Okada², Atsushi Yabe², Guangxin Wang¹, Akiyoshi Osaka^{1,3}, Takuya Matsumoto² (¹Department of Materials Science & Engineering, Henan University of Science and Technology, China; ²Department of Biomaterials, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University; ³Faculty of Engineering, Okayama University)

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

炭酸アパタイト製骨補填材の実用化を見据えた薬事許認可取得

株式会社ジーシー

○山本 克史, 園田 秀一, 熊谷 知弘

【緒言】

弊社は、九州大学石川邦夫教授との共同研究により、骨補填材の成分としては、新規成分である炭酸アパタイト製の骨補填材の開発に成功した。

本品は、生体内で用いるにあたり、高い品質と安全性が要求された。また、動物を用いた性能評価により、本品の吸収および吸収部位への新生骨形成を実証した。さらに、徳島大学宮本教授らによる治験（国の承認を得るための成績を集める臨床試験）を経て、歯科用骨補填材としては初めて、すべての歯科用インプラントに係る適応を取得した。

本発表では、新規成分である炭酸アパタイト製骨補填材の実用化を見据えた薬事許認可取得までの流れについて報告する。

【製品の概要】

製品名	ジーシー サイトランス グラニュール（承認番号：22900BZX00406000）
一般的名称	吸収性歯科用骨再建インプラント材（クラスIV）
特徴	本品の最大の特徴は、生体骨と類似した組成である炭酸アパタイトを成分としていることである。これにより、本品を骨欠損部位に補填すると、骨が線維性結合組織の介在なしに本品と結合する（骨伝導性）。また、生体骨と同様に骨のリモデリングによる本品の吸収および吸収部位への新生骨形成が期待される。
使用目的又は効果	歯科領域（口腔外科、歯周外科等）で使用される骨補填材である。既存品の適用である上下顎骨・歯槽骨の骨欠損の補填、インプラント体埋入時にインプラント体が露出した部分の補填に加えて、インプラント体の埋入を前提とした二次的再建時の骨補填（母床骨のみではインプラント体の固定が得られない場合の待時埋植）ならびにインプラント体の埋入と骨補填を同時に実施する骨補填に適用可能である。

【薬事許認可取得までの流れ】

実用化にあたり、まず初めに、生体内埋植材料としての高い品質を保ち、なおかつ大量に合成可能な製造方法の確立に取り組んだ。製造方法の確立後、PMDA（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）との各種相談・協議を経て、品質を担保するための評価項目を設定し、本品の品質を担保した。以降、すべての評価は品質が担保されたサンプルを用いて行った。安全性に関しては、厚生労働省通知（ガイドライン）に従い、本品に対して要求されるすべての生物学的安全性試験を実施し、安全性を担保した。性能に関しては、本品の吸収性を鑑みた性能評価及び実臨床に則した評価を行い、PMDAとの各種相談・協議を経て、性能担保に至った。臨床評価に関しても、同様にPMDAとの各種相談・協議の結果、歯科用インプラントフィクスチャとの併用による治験を実施し、本品の有効性及び安全性を実証した。

【考察】

本品の開発には、2004年からの探索とスクリーニングも含めると14年を費やし、2017年12月14日に薬事承認を得た。長い年月を費やしたものの結果的には、PMDAの相談を積極的に活用し、担当者間での協議を行うことで、実用化に至ることができた。本品の実用化が、患者のQOL向上の一助となることを期待する。

Regulatory approvals in anticipation of practical use of bone substitute material made of carbonate apatite.

Katsushi Yamamoto, Hidekazu Sonoda, Tomohiro Kumagai

GC CORPORATION

Tel: +81-3-3965-1856, Fax: +81-3-3965-1493, E-mail: katsushi.yamamoto@gc.dental

L-アルギニンキャリアとしてのポリグリセロールデンドリマーの分子設計

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻
○酒元 竜, 大谷 亨

近年、従来のがん治療法に変わる新たな治療法として、がん免疫療法が注目されている。とりわけ、免疫チェックポイント阻害剤による治療や、免疫細胞療法に関する研究が広く行われている。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤では、一般に一種類の経路しか阻害できない点が課題であり、樹状細胞を用いた免疫細胞療法では、がん抗原の発現が必須となるのが不可欠である。従って、これらの方

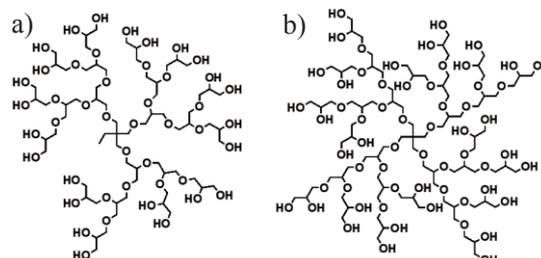


Fig. 1 Chemical structure of a) 3-arm PGD and b) 4-arm PGD

法以外のがん免疫療法の検討は、新たな治療法を提案できる点で価値がある。われわれは、これらの問題点を克服し得るがん治療法として、アルギニンデリバリーによるがん免疫療法に着目している。免疫細胞の1つであるマクロファージは、L-アルギニン(L-Arg)を代謝し一酸化窒素(NO)を産生することでがん細胞を死滅させるという機構を有している。長崎らは、L-Argを共有結合によりポリマー化することでミセルを形成し、EPR効果による受動的ターゲティングによって効果的にL-Argをマクロファージへデリバリーすることを考案している¹⁾。われわれは、L-Argをデリバリーするキャリアとして、生体適合性に優れかつナノサイズのポリグリセロールデンドリマー(PGD)に着目している(Fig. 1a)。これまでに、PGDは純水中でL-Argと極めて高い結合定数(10^6 M^{-1})で結合することを見出し、L-Argデリバリーの可能性がある分子としての予備的知見を得ている²⁾。しかしながら、血清中や細胞内環境下でのL-Arg保持性は十分とはいえない。さらに、マクロファージへのターゲティング性の付与も不可欠であるため、これらの課題を克服することが極めて重要である。そこで本研究では、血清などの高塩濃度・高タンパク質濃度条件下においてもL-ArgをPGDへ保持させるため、PGDの構成原子密度を増加させることを試みた。PGDとL-Argの相互作用は、PGDのエーテル酸素とL-Argのグアニジノ基による静電的相互作用、及び、PGD内部に存在する疎水場との疎水性相互作用によるものと考えられるため、NaCl存在下では、 Na^+ がPGD内部に入り込むことで静電的相互作用を阻害していると推測される。 Na^+ 侵入の抑制とPGD内部の疎水性の増加を目的に、4つのOH基から枝分かれを増加させた4-arm PGDの合成を行った(Fig. 1b)。現在、得られた4-arm PGDとL-Argとの生理的条件下での相互作用を評価している。当日は、これらの結果とマクロファージへの標的指向性を付与するための化学修飾の成果についても報告する予定である。

【参考文献】

- 1) Kudo, S.; Nagasaki, Y., *J. Controlled Release* **2015**, *217*, 256-262.
- 2) Ooya, T.; Lee, H., *ChemNanoMat* **2015**, *1*, 264-269.

Molecular Design of Polyglycerol Dendrimers as a L-Arginine Carrier

Ryu Sakemoto, Tooru Ooya

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

グリオブラストーマ細胞における 5-ALA 応答不均一性に関する検討

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

○米田 滉平¹, 末 信一郎^{1,2}, 藤田 聡^{1,2}

【緒言】近年、悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ(GBM)の診断および治療において、5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた光診断や光治療が注目されている。5-ALA は正常細胞では酸化的リン酸化により、ヘムタンパク質へと代謝される。しかし腫瘍細胞では、ATP 産生はワールブルグ効果により酸化的リン酸化ではなく、解糖系ドミナントにおこなわれるため、投与された 5-ALA は、代謝経路途中のプロトポルフィリン IX (PPIX)として蓄積される。このように腫瘍細胞に選択的に蓄積された PPIX を、UV で励起させた赤色蛍光分子として利用するのが 5-ALA の光診断や光治療である。これは腫瘍細胞のみを識別・治療できるため GBM の新しい治療戦略として大いに期待されているがごく最近になり、5-ALA が投与された腫瘍細胞の PPIX 蛍光強度には細胞間の不均一性があることが報告されている。また、転移した GBM には 5-ALA 陽性の症例と陰性の症例があり、陰性の症例の方が癌の進行度が高いことも報告されている。これらのことから考えると、5-ALA 投与で蛍光陰性を示す細胞は、腫瘍細胞の中でもワールブルグ効果の影響が小さく、酸化的リン酸化の活性が高い細胞であり、効率的に ATP が生産されているために、移動性が高い細胞であるという可能性が考えられた。そこで、本研究では、5-ALA 陽性細胞と陰性細胞との移動性および蛍光強度をシングルセルレベルで定量的に解析することにした。ここでは、脳組織中の細胞の移動性を評価するために、脳組織の繊維状の構造を模倣したナノファイバー基材を用いることにした。

【実験】GBM 細胞株の U-251 細胞を 5-ALA 存在下で平面 dish 上に 1.0×10^3 cells/cm² の密度で播種し、シングルセルのタイムラプス観察を行った。細胞の蛍光強度と遊走速度を定量化した。また、ポリ 3-ヒドロキシ酪酸-3-ヒドロキシヘキサ酸共重合体(PHBH) ナノファイバー上に 5-ALA 存在下で細胞を播種し、細胞の蛍光強度と遊走性を同様に評価した。PHBH ナノファイバーはエレクトロスピニング法を用いて作製し、あらかじめ酸素プラズマ処理しておいた。また、酸化的リン酸化阻害剤 Oligomycin および Rotenon 存在下で、同様にタイムラプス観察を行い、ミトコンドリア活性と細胞の移動性の関係についても評価をおこなった。

【結果および考察】5-ALA 陰性細胞は 5-ALA 陽性細胞よりも移動速度が大きかった(Fig. 1)。また、ファイバー上でも遊走速度と蛍光強度の関係性を調べると、陰性細胞の方が遊走速度が大きかった。また、酸化的リン酸化阻害剤 Oligomycin および Rotenon 存在下で、5-ALA 陰性細胞は大きく移動する際に、酸化的リン酸化の ATP を用いていることが示唆された。本結果は 5-ALA の治療有効性にも直結する結果であるため、さらなる慎重な検討をおこなう必要がある。腫瘍細胞は悪性度が進行するにつれ、周囲との細胞間接着を緩め、高い運動能を獲得する細胞へと変異する。変異した細胞は基底膜を破り、周囲の組織へ移動することで癌の浸潤・転移が開始する。癌の悪性度と移動性の関係については十分な理解がなされておらず、5-ALA 応答性と移動性についての知見が得られれば、GBM の治療戦略への利用も期待される。

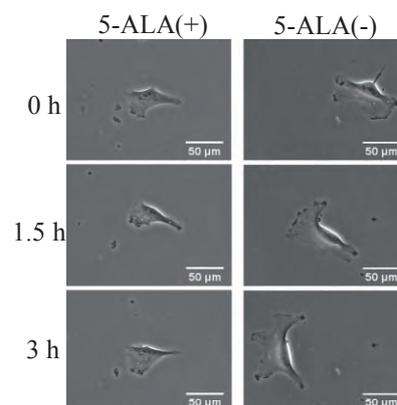


Fig.1 Cell dynamics of 5-ALA(+) cells and 5-ALA(-) cells

Analysis of heterogeneity of glioblastoma cells in response to 5-aminolevulinic acid

Kohei YONEDA¹, Shin-ichiro SUYE^{1,2} and Satoshi FUJITA^{1,2}

¹ Department of Frontier Fiber Science and Technology, 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

Silver nanoparticles affect the cellular response of Tumor Necrosis factor- α

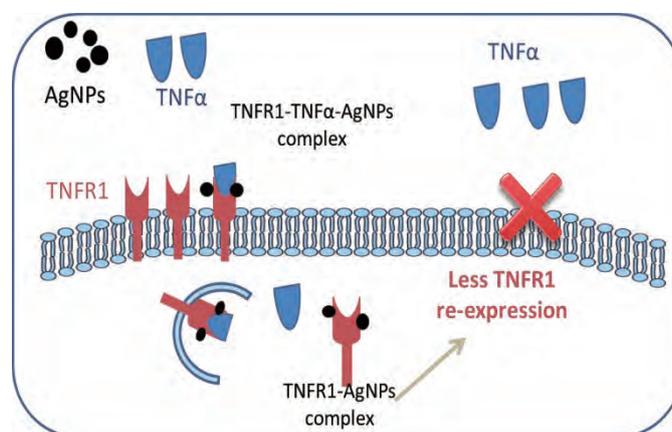
○ Alaa Fehaid (Presenter)^{1, 2, 3}, and Akiyoshi Taniguchi^{1, 2}

1. Cellular Functional Nanobiomaterials Group, National Institute for Materials Science, Japan
2. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.
3. Forensic Medicine and Toxicology Department, Faculty of Vet. Med., Mansoura Uni., Egypt
TANIGUCHI.Akiyoshi@nims.go.jp , AHMED.Alaa@nims.go.jp

Introduction: Silver nanoparticles (AgNPs) have been used in many products because of its anti-inflammatory properties. Tumor necrosis factor- α (TNF α) is a pro-inflammatory cytokine which is an early marker in cell inflammation; also, it induces apoptosis by different pathways. It is very important to know the molecular mechanism of the cellular response to control the NPs-cells interaction. Therefore, our study aimed to investigate the effect of AgNPs on the cellular response of TNF α and to determine the molecular mechanism of its effect.

Method & results: Lung epithelial cell line was exposed to AgNPs (5 μ g/ml) and/or TNF α (20 ng/ml) for 24 h, the cytotoxic effect of AgNPs has been analyzed showing an increase in the cytotoxic effect by increasing the concentrations of AgNPs. Then, flow cytometric assay has been established; our results showed that the cellular uptake of AgNPs has been significantly increased in presence of TNF α . Also, AgNPs significantly decreased the apoptotic effect of TNF α . Confocal microscopy results revealed that Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) localized inside the cells with very few receptors scattered on the cell membrane of the cells exposed to both AgNPs and TNF α while the receptors were homogenously distributed on the cell membrane in control cells and cells exposed to TNF α only indicating that AgNPs affect the localization of TNFR1.

Conclusion: Our study concluded that the low concentration of AgNPs showed an anti-apoptotic effect against the apoptosis induced by TNF α . Also, we provided a new possible mechanism of the anti-apoptotic effect of AgNPs by its effect on the TNF α receptor1.



Silver nanoparticles affect the cellular response of Tumor Necrosis factor- α

○ Alaa Fehaid^{1, 2, 3}, 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.
3. Forensic Medicine and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Egypt
TANIGUCHI.Akiyoshi@nims.go.jp, AHMED.Alaa@nims.go.jp

マクロファージの生物機能に与える培養基材物性の影響

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

○森岡 智子, 城 潤一郎, 田畑 泰彦

【緒言】

細胞は、生理活性物質などの化学刺激だけでなく、基材の硬さなどの力学的な性質にも影響を受け、その挙動を変化させることが知られている。本研究の目的は、細胞培養基材の硬さが細胞挙動に与える影響を調べることである。本研究では、ゼラチンを化学架橋することで、硬さの異なるゼラチンハイドロゲルを作製した。それらのゼラチンハイドロゲル基材上で培養されたマクロファージの挙動を調べた。

【実験】

異なる濃度のゼラチン(重量平均分子量 100,000, 等電点 5.0, 新田ゼラチン株式会社より供与)の水溶液を調製し、濃度の異なるグルタルアルデヒド (GA) 水溶液を添加して、ゼラチンハイドロゲルを作製した。グルタルアルデヒドの重量は、ゼラチンの重量に対して 1 wt%となるようにした。得られたゼラチンハイドロゲルを 37°C の 2 回蒸留水中で 3 日間膨潤させた後、圧縮測定を行い、得られた応力-ひずみ曲線の直線部分の傾きから弾性率を計算した。また、異なる弾性率をもつゼラチンハイドロゲル上にマクロファージを播種し、培養した後、細胞接着数とサイトカインの産生について調べた。

【結果と考察】

ゼラチン水溶液の濃度の増加とともに、ゼラチンハイドロゲルの弾性率は増加した。弾性率増加の理由として、単位体積あたりに存在するゼラチンの分子数が増加し、架橋点が多くなったことが考えられる。また、異なる弾性率をもつゼラチンハイドロゲル上でマクロファージを培養したところ、ゼラチンハイドロゲルの弾性率に関係なく、いずれのゼラチンハイドロゲルにも、細胞が接着、増殖することがわかった。発表では、ゼラチンハイドロゲルの硬さがサイトカインの産生に与える影響についても報告する。

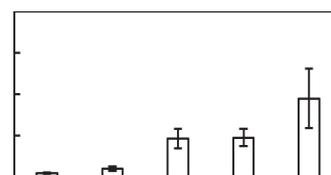


図. 異なるゼラチン水溶液の濃度で作製したハイドロゲルの弾性率 (GA 濃度: ゼラチン水溶液濃度 5, 7, 10, 12 および 15 wt% に対して, 5, 7, 10, 12 および 15 nM)

Effect of culture substrate property on the biological function of macrophages

Tomoko MORIOKA, Jun-ichiro JO, and Yasuhiko TABATA

Department of Regeneration Science and Engineering, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

Tel: +81-75-751-4128, Fax: +81-75-751-4646, E-mail: morioka.tomoko.42n@st.kyoto-u.ac.jp

がん組織環境にตอบสนองしてタンパク質医薬を放出しうる 多重刺激応答性ハイドロゲルの調製

東理大院基礎工¹・阪大院工²
○多湖萌野¹・茅野英成¹・麻生隆彬²・石原量¹・菊池明彦¹

[緒言] 近年、がん化学療法に抗体医薬に代表されるタンパク質医薬品が強力な治療効果を発現する治療薬として利用されている^[1]。しかし、生体内ではタンパク質の失活や分解が生起すると、薬効の低減や標的部への送達効率が低下する。そこで、タンパク質を安定に内包しつつ、標的部で放出可能な薬物送達キャリアとして、高含水性で生体適合性のハイドロゲルは有用と考えられる。ハイドロゲルを外部刺激にตอบสนองさせ、自身の機能を変化させることができれば、薬物内包効率の向上や、放出の引き金として用いることが可能になる^[2]。さらに、DDS キャリアは内包物を放出後に分解し体外へ排泄されることが望ましい。そこで還元環境下で分解性を示すジスルフィド結合に注目した。当研究室では架橋部位にジスルフィド結合を導入し、還元環境下で分解するハイドロゲルを報告している^[3]。本研究では、温度、pH、還元環境、の各刺激にตอบสนอง可能なハイドロゲルを調製し、タンパク質の固定・放出メカニズムを検討することを目的とした。この概念を **Fig. 1** に示す。

[実験] ポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル (PEGDE)とシスタミン (CA)を NaOH 水溶液中で反応させハイドロゲルを調製した。ディスク状に成形したゲルを PBS (pH 7.4), もしくは PB (pH 5.0-8.4)中に浸漬し、10-45°Cでの膨潤度を算出した。さらに、3 mmol L⁻¹ ジチオトレイトール(DTT)含有 PB 溶液中での分解試験を実施した。最後に、タンパク質内包ゲルを調製し、還元環境下での放出試験をした。タンパク質は、蛍光標識したウシ免疫グロブリン G (FITC-IgG) (MW = 150,000, pI 7.2), ウシ血清アルブミン (FITC-BSA) (MW = 66,000, pI 4.8), インスリン (FITC-Insulin) (MW = 5,700, pI 5.4)を用いた。

[結果と考察] 調製したハイドロゲルの複数刺激にともなう膨潤収縮挙動を調べた。ハイドロゲルは pH 7.4 で昇温とともに収縮した。これは、ハイドロゲルが親水性で短鎖長の PEG と比較的疎水性の CA から成るためと考えられた。酸性環境下で膨潤度が大きくなった。得られたハイドロゲルはCA由来の三級アミノ基を含むため pKa を 6.21 (37°C)に有し、酸性環境下でアミノ基がプロトン化にともない吸水し、浸透圧の増大により膨潤したと考えられる。さらに、DTT 溶液中では、ゲルは崩壊し完全に水溶性化した。すなわち、三次元網目構造中にジスルフィド結合を導入することで、還元環境下で崩壊するゲルを調製できた。次に、温度変化にともなう膨潤収縮挙動を利用して、タンパク質内包ハイドロゲルを調製したところ、ディスクゲル1枚あたりのタンパク質内包量は、IgG < BSA < Insulin であり、タンパク質分子量の低下にともない内包量は多くなった。**Fig. 2** に BSA の放出挙動を示す。PB(pH 5.4)中では BSA を放出しなかったのに対し、3 mmol L⁻¹ DTT 含有 PB 溶液中では、1 h 以内にすべて放出された。すなわち、酸性環境下ではハイドロゲルが正、BSA が負に帯電することから、静電相互作用によりタンパク質を内包・保持する一方、還元環境にตอบสนองしてタンパク質を放出することがわかった。したがって、がん細胞周辺環境の酸性環境下においてはタンパク質を安定に内包し、がん細胞内環境にตอบสนองして放出しうることを示す。以上より、調製したハイドロゲルは、温度、pH、および還元環境応答性を示し、刺激にตอบสนองした膨潤収縮挙動を利用してタンパク質を安定に内包かつ、がん細胞内環境において放出可能な DDS キャリアとして応用が期待できる。

[参考文献] [1] P. R. Hari *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1996**, 59, 1795-1801. [2] P. Gupta *et al.*, *Drug discovery today*, **2002**, 7(10), 569-579. [3] K. Yamawaki *et al.*, *Coll. Surf. B.*, **2016**, 146, 343-351.

Preparation of multistimuli-responsive hydrogels capable of releasing protein drugs in response to tumorous tissue

Moeno TAGO¹, Hidenari KAYANO¹, Taka-Aki ASOH², Ryo ISHIHARA¹, Akihiko KIKUCHI¹, (¹Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo University of Science, 6-3-1 Nijuku, Katsushika-ku, Tokyo 125-8585, Japan, ²Dept. Appl. Chem., Osaka University, Suita, Osaka, Japan, Tel: +81-3-5876-1415, Fax: +81-3-5876-1639, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

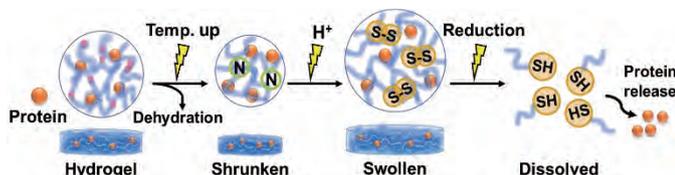


Fig. 1 Schematic image of thermo-, pH- and reduction-responsive hydrogel and stimuli-responsive protein release.

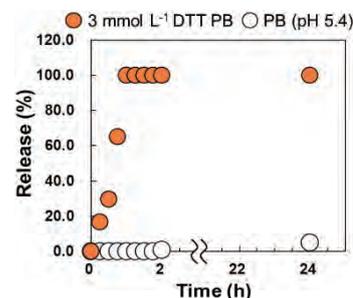


Fig. 2 Release of BSA from disk-gels in PB and 3 mmol L⁻¹ DTT PB solution.

ATP 応答性ナノ集合体の調製と DDS キャリアへの展開

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大 ORDIST
 ○土谷 平¹, 河村 暁文^{1,2}, 宮田 隆志^{1,2}

【緒言】近年, さまざまな疾患に応じて発現量が変化する生体分子が報告されており, 新たなバイオマーカーとして注目されている。例えば, アデノシン三リン酸 (ATP) は細胞内に存在しており, 細胞運動やタンパク質合成などの幅広い生体内反応に使用され, アデノシン二リン酸 (ADP) に分解される。通常, 細胞内の ATP/ADP 比は一定に保たれているが, 細胞へのストレスにより変化することが報告されている。そのため, 細胞内 ATP/ADP 比の変化を認識して応答する材料は, 細胞ストレスを感知する新規なスマートバイオマテリアルとして期待される。そこで, 本研究では ATP に応答するナノ集合体の創製を目的として, 可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により, 親水性ブロックと側鎖にチミンを有する疎水性ブロックとを有する両親媒性ブロック共重合体を合成した。また, 得られたブロック共重合体を用いて自己集合体を調製し, ATP の添加によるナノ集合体の応答について検討した。

【実験】まず, poly(ethylene glycol) methacrylate (M_n : 1,020; PEGMA) と 4-cyano-4-(thiobenzoylthio) pentanoic acid, 4, 4-azobis(4-cyanopentanoic acid) (ACVA) を用い, RAFT 重合により PPEGMA マクロ RAFT 剤を合成した。続いて, PPEGMA マクロ RAFT 剤と ACVA を用いた vinylbenzyl thymine (VBT) の RAFT 重合により PPEGMA-*b*-PVBT を合成した。得られた PPEGMA-*b*-PVBT を dimethyl sulfoxide に溶解させ, 水に対して透析することにより PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体を形成させた。動的光散乱法 (DLS) により, さまざまな ATP 濃度における PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体の粒径を測定し, その ATP 応答挙動を評価した。さらに, モデル薬物として Rhodamine 6G をナノ集合体に内包させ, ATP に応答したナノ集合体からの放出挙動を検討した。

【結果・考察】¹H NMR 測定の結果, 得られた PPEGMA-*b*-PVBT の PPEGMA ブロックおよび PVBT ブロックの重合度はそれぞれ 55 および 157 であることがわかった。動的光散乱測定および透過型電子顕微鏡観察より, このブロック共重合体を用いて調製したナノ集合体は水中で 150 nm 程度の球状の集合体を形成することがわかった。また, この PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体は生理的イオン強度であるリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) 中においても水中と同程度の粒径を維持することができた。さらに, この PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体分散液に ATP を添加すると, ナノ集合体の粒径が増加した。これは, ナノ集合体コアに存在する PVBT ブロックのチミン部位と高い親水性を有する ATP とが相互作用することにより, PVBT ブロックの親水性が増加して疎水性相互作用が低下するためと考えられる。

Fig. 1 には, Rhodamine 6G を内包した PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体を PBS(-) および 50 mM の ATP を含む PBS(-) 中に分散させた際のナノ集合体からの Rhodamine 6G の放出挙動を示した。図より, PBS(-) 中では Rhodamine 6G の放出が抑制され, ATP 存在下では放出が有意に増加していることがわかる。PVBT ブロックのチミン部位と ATP との相互作用により PVBT ブロックの疎水性相互作用が低下するため, PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体に内包された Rhodamine 6G の放出速度が ATP 存在下で大きくなったと推察される。

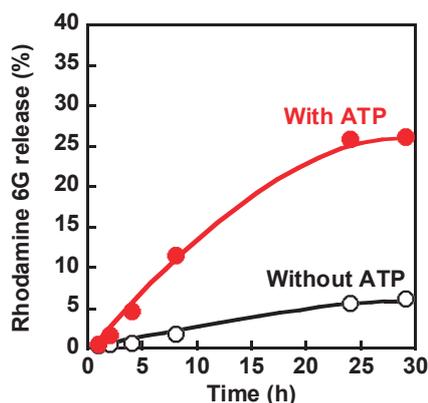


Fig. 1. Release profiles of Rhodamine 6G from PPEGMA-*b*-PVBT nano-assemblies in PBS(-) with (●) and without 50 mM of ATP (○).

Preparation of ATP-Responsive Nano-assemblies for DDS Carriers

Taira Tsuchiya¹, Akifumi Kawamura^{1,2}, Takashi Miyata^{1,2}

¹Fac. of Chem., Materials and Bioeng. and ²ORDIST, Kansai Univ., 3-3-35, Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan. Tel: +81-6-6368-1978, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: akifumi@kansai-u.ac.jp

ペプチド・高分子複合体による脂質膜の形態制御：共重合体のアンカリング効果

東京工業大学生命理工学院

○竹中智香、落合拓郎、嶋田直彦、丸山厚

【緒言】 インフルエンザ融合タンパク質であるヘマグルチニンのN末端部位を模倣したE5ペプチドは酸性条件下において両親媒性の α -helix構造を形成し、会合体となって膜破壊機能を発現する^{1,2}。当研究室では、Poly(allylamine)-*graft*-Dextran (PAA-*g*-Dex)が静電相互作用によりE5と可溶性複合体を形成し、中性条件下でE5を α -helix構造へと転移させ、膜破壊を誘起することを見出した³。さらに、E5/PAA-*g*-Dex複合体をGUV (Giant Unilamellar Vesicle)

(組成比0.2 mol% Rhodamine labeled-DOPE, 0.2 mol% PEG2k-DSPE, 99.6% DOPC)に作用させるとベシクルからシートへの構造転移が誘起された (Fig. 1)⁴。この構造転移を利用することで、生体内への薬物デリバリーへの応用、脂質ベシクル・シート変換型デバイスとしての機能が期待される。また脂質シートについて、ある時間経過後にベシクルへと復帰する現象(時限応答)も確認できている。これは脂質シートの親・疎水界面を安定化しているE5/PAA-*g*-Dex複合体の膜からの解離によると考えられ、デバイス化に向けてこれを制御することが重要と考える。そこで、本研究では脂質膜に修飾可能な疎水性のアシル基を導入したPAA-*g*-Dexを合成し、PAA-*g*-Dexの脂質膜上への搭載と脂質シート構造の安定化を目指した。

【実験方法】 ステアリン酸のカルボキシ基とPAA-*g*-Dexのアミノ基をPyBOPにより縮合し、ステアリル(SA)基導入率の異なるPAA-*g*-Dex-SA (PD-xS: SA基導入率x mol%)を合成した (Fig. 2)。SA基導入率は¹H NMR測定から計算した。PD-Sが脂質膜表面上に修飾されていることを評価するために、SUV (Small Unilamellar Vesicle)を用いて表面ゼータ電位を測定した。蛍光標識したGUV懸濁液に濃度の異なるPD-Sを混合し、インキュベートによりPD-Sの脂質膜表面修飾を行った。さらにE5添加後、脂質構造の経時変化を観察した。

【結果と考察】 ¹H NMR測定からPD-2S, PD-8Sの調製を確認した。表面ゼータ電位測定結果から、PD-xS未修飾SUVと比較して、PD-2S, PD-8SとインキュベートしたSUV表面はより正に帯電した。以上より、脂質膜表面に修飾するために十分なSA基をPAA-*g*-Dexに導入できたことを確認した。PD-xS (x=0, 2, 8)はいずれもE5とともにGUVをベシクルからシートへと構造変化させたが、SA基導入率によって、脂質シートの形成能と安定性に違いが見られた。まず、SA基導入率が高くなるほど、より低濃度のPD-xSにおいて高いシート形成能を示し、また形成されたシートの寿命も長くなった。これは、SA基によりPAA-*g*-Dexがより多く膜上に分配し、さらにE5の膜への分配を促した結果と考えられる。実際に、蛍光顕微鏡観察からベシクル復帰後もPD-Sが脂質膜上に保持されていることが確認できた。以上より、SA基を導入することでPAA-*g*-Dexの結合が安定化され、シート形成性やその安定性を制御できることがわかった。

参考文献 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.

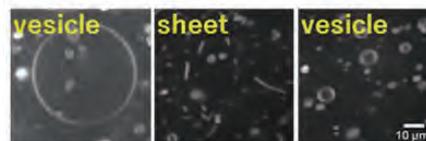


Fig 1. The confocal microscopy images of lipid membrane structures changed from vesicles to sheets by E5/PAA-*g*-Dex and spontaneously back to vesicles.

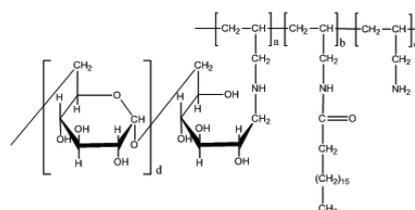


Fig 2. The structure of PAA-*g*-Dex-SA

Controlling lipid membrane structures from vesicles to sheets with peptide/copolymer complex : the effect of anchoring copolymers on membranes

Tomoka Takenaka, Takuro Ochiai, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama

School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

Tel: +81-45-924-5762, E-mail: amaruyama@bio.titech.ac.jp

S/O/W 型アジュバントによる抗原提示細胞の活性化と抗原送達能の向上

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

○水野 梨瑚¹, 田原 義朗¹, 若林 里衣^{1,2}, 神谷 典穂^{1,2,3}, 後藤 雅宏^{1,2,3}

【緒言】

ワクチンとは病原体由来の抗原を体内に投与し、抗原特異的な免疫を活性化する医薬品である。多くのワクチンは抗原とアジュバント（免疫を活性化する効果をもった添加剤）から構成されており、これらを高効率に免疫細胞に送達する様々なデリバリーシステムが報告されている。しかしながら、その多くはヒトへの効果や安全性の問題で、実用化に至っていないというのが現状である。一方でOil-in-Water (O/W) 型エマルジョンアジュバントは実用化されており、ヒトでの安全性が保障されているが、水溶性の抗原とO/Wエマルジョンが別々に投与されているため、免疫細胞への抗原とアジュバントの同時送達が難しい。そこで本研究では、水溶性タンパク質の油中ナノ分散化技術 (Solid-in-Oil化技術) を利用して、O/WエマルジョンのOil相に抗原をナノサイズで分散した Solid-in-Oil-in-Water (S/O/W) 型エマルジョンアジュバントの創製を試みた。更に、親油性の toll-like receptor (TLR) リガンド分子、R848 を Oil 相に組み込むことで、相乗的な免疫活性の向上を狙い、新規免疫 DDS キャリアとしての応用を目指した (Fig.1)。



Fig.1 S/O/W エマルジョンの概念図

【実験】

S/O/W のサンプルは Table1 の組成で調製した。PBS で 10 倍に希釈したのち遠心分離 (20°C、20,000g、15 min) を行った。水相の 7 割を培地置換し、これをさらに 5 倍希釈して RAW 細胞に投与した。比較対象として、同様の組成からなる O/W+OVA サンプルを用意した。この際 OVA 濃度について、S/O/W サンプルにおける抗原封入率や培地置換の影響を加味したうえで、0.1 mg/g とした。

マウス由来抗原提示細胞 (RAW 細胞) を 2.0×10^5 cells/mL となるように培地で希釈し、12well プレートに各 2 mL/well ずつ播種しインキュベートした。24 時間後、上記のように作製したサンプルを用いて、前日に播種したプレート内の培地を交換した。更に 24 時間後、FACS による分析を行った。7AAD を用いて死細胞を除去し、PE-I-Ad (MHC class II) 抗体、PECy7-CD40 抗体、APC-CD80 抗体を標識抗体として用いた。

【結果と考察】

CD40 と CD80 を共発現した活性化細胞において、抗原とアジュバントを別々に投与したサンプル (O/W+OVA) と比較し、S/O/W エマルジョンの方が OVA のデリバリー能が向上することが確認された (Fig. 2)。以上より、S/O/W エマルジョンの抗原とアジュバントを同時封入している性質により、活性化した抗原提示細胞に効率よく抗原をデリバリー可能であり、強力な抗原提示を促進できることが示唆された。

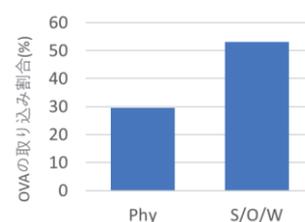


Fig. 2 抗原提示活性化評価

Improvement of APC activation ability using solid-in-oil-in-water adjuvant

Riko Mizuno¹, Yoshiro Tahara¹, Rie Wakabayashi^{1,2}, Noriho 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: +81-92-802-2808, Fax: +81-92-802-2810, E-mail: mizuno.riko.822@s.kyushu-u.ac.jp

ヒアルロン酸被覆高分子ミセルによる肝星細胞への選択的薬物配送

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大 ORDIST, ³ 奈良県立医科大, ⁴ 関西大医工薬連携研究セ
 ○永田拓也¹, 山田莉央¹, 能崎優太², 鍛冶孝祐³, 吉治仁志³, 葛谷明紀^{1,4}, 大矢裕一^{1,4}

【緒言】

肝硬変とは慢性的な肝炎などによる肝損傷の修復の際に、過度に活性化した肝星細胞が過剰にコラーゲン線維を産出することで肝臓が硬化する疾病である。肝硬変を治療するための一つの手段として、コラーゲン線維産生を抑制する薬剤(抗線維化薬剤)を肝星細胞に選択的にデリバリーする事が有効であると考えられる。肝星細胞は肝類洞壁内部に存在するため、肝星細胞へ薬物を送達するには、まず肝類洞内被細胞(LSEC)層への薬剤分布および透過が必要であると考えられる。一方我々はこれまでに、生分解性のポリリシン-ポリ乳酸・AB ジブロック共重合体(PLys⁺-b-PLLA)から調製した表面に高密度の正電荷を有するナノサイズのコア-シェル型ミセルを、負電荷を持つ高分子電解質でポリイオンコンプレックス(PIC)形成により被覆した PIC 被覆ミセルが、通常の高分子ミセルよりも著しく高い希釈安定性を示すことを報告している¹。特にポリアニオンとしてヒアルロン酸(HA)を選択することにより、LSEC 表面に存在するレセプターによって認識され、HA で被覆したミセルが *in vitro* において LSEC に選択的に取込まれることを見出している²⁾。そこで、本研究では、肝星細胞への効率的な薬物配送を目的として、抗肝線維化薬剤を内包した HA 被覆ミセルを調製し、その体内動態や機能評価を行った結果を報告する。

【実験】

既報に従い合成した PLys⁺-b-PLLA に Texas Red を反応させ蛍光ラベル化した TR-PLys⁺-PLLA を用いて TR-PLys⁺-PLLA ミセルを調製した。一方、HA (MW=90,000Da) を 4-amino fluorescein を用いて蛍光ラベル化して Flu-HA を調製した。得られた Flu-HA 水溶液に TR-PLys⁺-PLLA ミセル水溶液を滴下し、二重ラベル化 HA 被覆ミセルを調製した。対照サンプルとして 4-amino fluorescein を用いて蛍光ラベル化したカルボキシメチルデキストラン (CMDex) で被覆した Flu-CMDex 被覆ミセルも同様に調製した。次に、ヒト不死化肝星細胞株 (LX2) の培養液中に調製したミセルを添加し、共焦点レーザー顕微鏡により細胞取り込みを評価した。さらに、Flu-HA 被覆ミセルをマウスに尾静脈注射し、所定時間後のマウスの臓器をそれぞれ取り出し、生体蛍光イメージング装置を用いてミセルの体内分布評価を行った。

【結果と考察】

調製した Flu-HA 被覆ミセルの LX2 細胞取り込み試験を行った結果、Flu-HA 被覆ミセルを添加した系は Flu-CMDex 被覆ミセルを添加した系と比較して、細胞内に Fluorescein と Texas Red の両方の蛍光が観察され、Flu-HA 被覆ミセルが細胞内に取り込まれていることが分かった。また、尾静脈注射 4 時間後のマウスの各臓器を取り出して生体蛍光イメージング装置を用いて評価した結果、Fluorescein と Texas Red のどちらの蛍光も他の臓器と比べて肝臓が最も高い値を示した。この結果から、Flu-HA 被覆ミセルは肝臓への高い集積性を示すことが示唆された。

1) Y. Ohya *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1750-1756.

2) Y. Ohya *et al.*, *J. Contr. Rel.* **2011**, *155*, 104-110.

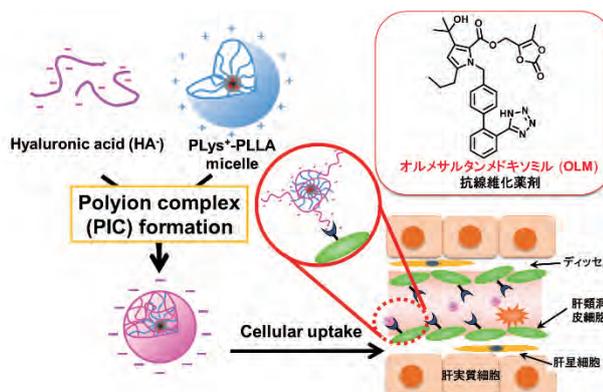


Fig. 1. Schematic illustration for preparation of polyion complex micelles and uptake behavior of it in LSEC.

Specific drug delivery to hepatic satellite cells by hyaluronic acid-coated micelles

Takuya Nagata¹, Rio Yamada¹, Yuta Yoshizaki^{1,2}, Kosuke Kaji³, Hitoshi Yoshiji³, Akinori Kuzuya^{1,2,4}, Yuichi Ohya^{1,2,4}

¹ Dept. of Chem. Mater. Eng., Kansai Univ., ² ORDIST, ³ Nara Med. Univ., ⁴ Collabo. Res. Ctr. Eng. Med. Pharm., Kansai Univ. ¹Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

温度応答性高分子とカチオン性高分子の混合ブラシによる温度制御型細胞分離

¹慶應義塾大学 薬学部

○若山 暖乃¹, 長瀬 健一¹, 金澤 秀子¹

【緒言】近年、再生医療の急速な発展に伴い、従来の低分子薬に代わる治療法として細胞移植や細胞シートを用いた治療法に注目が集まっている。細胞を治療に用いる際には他の不要な細胞と分離し精製する必要があるが、現在用いられる分離法では細胞を蛍光色素や磁気ビーズで標識するため、細胞活性の低下や人体への影響が懸念視される。そこで、温度応答性高分子であるpoly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)を用いたラベルフリーでの細胞分離の検討がされている。本研究では、PNIPAAmとカチオン性高分子であるpoly(*N,N*-dimethylaminopropyl acrylamide)(PDMAPAAm)の混合ブラシ修飾ガラス基板を製作し(Fig.1)、温和な温度変化にのみにより細胞の迅速な接着と脱着を制御する新規細胞分離法の開発を目指した。

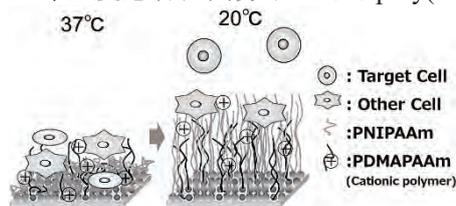


Fig. 1 Cell separation using mixed thermo-responsive and cationic polymer brush

【実験】ガラス基板(24×50 mm)に3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS)と ATRP開始剤である(chloromethyl)phenylethyltrimethoxysilaneをシランカップリング反応により固定化し、アミノ基に重合開始剤V-501を反応させて修飾した。その後、1,4-dioxane溶液中でRAFT重合によりPDMAPAAmを修飾し、ATRPによりPNIPAAmを修飾することで、PDMAPAAm、PNIPAAmの混合ポリマーブラシをガラス基板表面に構築した。基板に修飾されたポリマーの分子量を溶液中に生成したポリマーの分子量から推算した。また、ポリマー修飾基板表面及び実験に用いた細胞のゼータ電位を測定した。作製した基板に間葉系幹細胞(MSC)、骨芽細胞(Osteoblast)、子宮頸がん由来細胞(HeLa細胞)、ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を播種し、37°Cで6時間インキュベートした際の接着挙動を観察し、その後20°Cで3時間インキュベートした際の脱着挙動を観察した。

【結果と考察】作製した基板の全てに分子量10000程度のPNIPAAmが修飾されていることがわかった。RAFT重合におけるDMAPAAmモノマー濃度の上昇に伴い、PDMAPAAmの分子量が増加し、基板表面のゼータ電位の値が大きくなることがわかった。また細胞表面のゼータ電位測定により、MSCとHeLa細胞は強い負電荷を帯び、骨芽細胞は極めて弱い負電荷を帯びていることがわかった。作製した基板において、37°Cで負電荷の強いMSCとHeLa細胞を播種したところ、分子量の大きいPDMAPAAm修飾基板において高い接着速度を示した(Fig.2)。これは、基板表面の正電荷と細胞の負電荷の静電的相互作用により接着が促進されたためと考える。また、NHDFはPDMAPAAmの分子量の違いによる接着速度の差は見られず、骨芽細胞はいずれの基板においても接着がほぼ見られなかった。また、37°Cでの細胞接着後の20°Cに温度を変化したところ、接着していたMSCは速やかに脱着したが、HeLa細胞は3時間後も接着を維持していた。

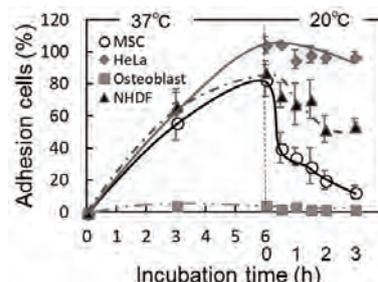


Fig. 2 Adhesion and detachment profiles on long PDMAPAAm and PNIPAAm modified surface

以上の結果より、温度応答性高分子とカチオン性高分子混合ブラシ修飾基板を用いる事で、細胞接着挙動の差を利用した温度制御による迅速なラベルフリー細胞分離の可能性が示された。

Temperature-modulated Cell Separation using Thermo-responsive and Cationic Polymer Brush

Haruno Wakayama¹, Kenichi Nagase¹, Hideko Kanazawa¹

¹Faculty of Pharmacy, Keio University

Tel: +81-03-5400-1378, E-mail: nagase-kn@pha.keio.ac

ポリアリルアミン/TiO₂ ナノ粒子複合体内封リポソームの調製と超音波力学療法効果

¹大阪府立大学大学院工学研究科
○露谷 政人¹, 弓場 英司¹, 原田 敦史¹

【緒言】近年、がん治療において外部刺激を併用した治療技術が注目されている。当研究室では、生体深達度の高い超音波を外部刺激に利用した超音波力学療法に関する研究を行ってきた。これまでに、超音波照射によって活性酸素種 (ROS) を生成する二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子とポリアリルアミン (PAA) にポリエチレングリコール (PEG) をグラフト化させた PAA-g-PEG からなるポリオンコンプレックス (PIC) ミセルを細胞に取り込ませた後、超音波照射することにより殺細胞効果が誘導されることを確認している (Biomaterials Science, 1, 65 (2013))。このシステムの更なる改善には、TiO₂ ナノ粒子をミト

コンドリア近傍へ送達し ROS を発生させることが有効であると考えられる。そこで本研究では、ミトコンドリアへのターゲティング能をもつトリフェニルホスホニウム (TPP) 基を導入した TPP-PAA を用い TiO₂ ナノ粒子との PIC を作製した。この PIC を pH 応答性高分子修飾リポソーム (Biomaterial, 35, 3091 (2014)) によりサイトゾルへ送達し、その後、PIC は TPP 基の効果によりミトコンドリアへ集積し、超音波照射による殺細胞効果の増強が期待される (Fig. 1)。

【実験】TPP-PAA (TPP 基導入率: 23%) を TiO₂ ナノ粒子と静電相互作用させ TPP-PIC を作製した。脂質薄膜を TPP-PIC を含む水溶液で分散させることによりリポソームを調製した。このリポソームを密度勾配遠心法により分離し、得られた fraction 1~5 の粒子径および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。PIC 内封リポソームについて、リポソーム表面に pH 応答性高分子である MGlu-Dex-C₁₀ の修飾を行い、ゼータ電位測定を行った。

【結果と考察】PIC 水溶液で脂質薄膜を分散し、密度勾配遠心した結果、5 つの層に分離された (Fig. 2)。各 fraction について、DLS 測定、ICP による Ti 濃度測定および脂質濃度測定を行った結果、fraction 2 及び 3 の Ti 濃度が他 3 つより高かった。そこで fraction 2 及び 3 について TEM 観察を行った。fraction 2 及び 3 は、どちらも 150~200 nm の球状粒子の存在が確認されたが、fraction 3 についてのみリポソーム膜と内水相の界面と推測される相分離した構造 (淡色の輪) が確認されたことから、fraction 3 が目的とした PIC 封入リポソームであると考えられる。この fraction 3 の PIC 封入リポソームへ MGlu-Dex-C₁₀ の修飾を行った結果、ゼータ電位の低下が確認されたことから pH 応答性高分子の修飾が示唆された。

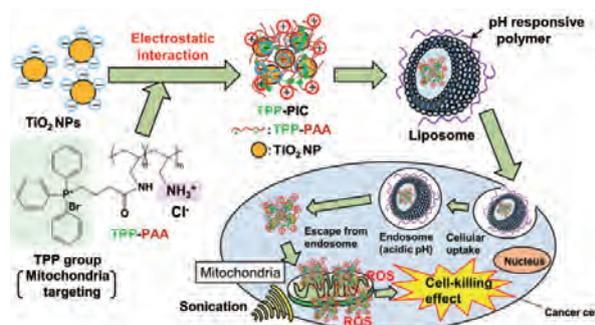


Fig. 1. Schematic image of pH-responsive polymer-modified liposome incorporated TiO₂ nanoparticles/TPP-PAA polyion complexes for sonodynamic therapy.

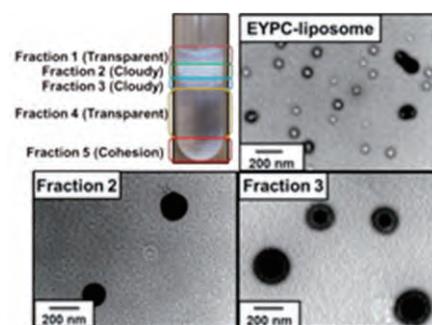


Fig. 2. Purification by density gradient centrifugation and TEM images of empty liposome, fraction 2 and 3.

Preparation of Polyallylamine/TiO₂ Nanoparticle Complexes-Loaded Liposomes

Masato TSUYUTANI¹, Eiji YUBA¹ and Atsushi HARADA¹

¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, Sakai 599-8531, Japan

Tel: 072-254-9913, Fax: 072-254-9913, E-mail: mb105064@edu.osakafu-u.ac.jp

可逆的性質変化を起こす機能性リポソームの開発

慶應義塾大学大学院薬学研究科

○藤條 恵, 根本 遼, 綾野 絵理, 長瀬 健一, 米谷 芳枝, 金澤 秀子

【緒言】 Polyethylene glycol (PEG)修飾リポソームはパッシブターゲティングによるがん組織への集積に有効な手段である。しかし PEG 修飾リポソームはその安定性のために標的細胞に取り込まれにくく、薬物放出が十分に行われにくいという欠点が存在する。この欠点を解決するために、熱や pH などの外部刺激に応答する高分子を修飾したリポソームにより、標的組織で薬物放出制御を行う検討がなされている。我々はこれまでに、リポソームの薬物放出や細胞内取り込みへの温度応答性高分子の影響を検討してきた。中でも、カチオン性リポソームに温度応答性高分子を修飾することで薬物放出や細胞内取り込みが促進されることが分かった。さらに本研究では、外部温度変化によるリポソームの性質の可逆変化とそれに伴う薬物放出制御、細胞内取り込み制御を実現する機能性リポソームを開発した(Fig. 1)。

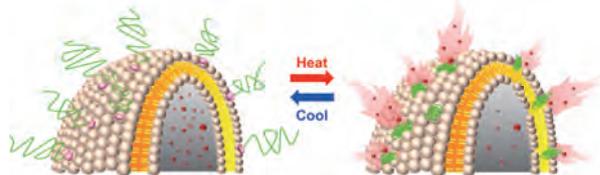


Fig. 1. Schematic image of functional liposome for reversible property changes.

【実験】 連鎖移動剤として 3-mercaptopropionic acid (MPA)、ラジカル開始剤として 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN)を用いて *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm)と *N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm)を共重合させ温度応答性高分子を合成した。作製した温度応答性高分子をリポソームに修飾させるためにポリマーのカルボキシ末端を *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)と *N*-hydroxysuccinimide (NHS)を用いてスクシニル化し dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)をアンカーとして結合させた。リポソームは薄膜法で作製した。動的な光散乱法によりリポソームの温度依存的な粒子径変化を測定した。また、リポソームの各温度での細胞への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果と考察】 リポソームに修飾した温度応答性高分子の影響を調べるために、30℃から50℃まで1℃間隔でリポソームの粒子径を測定したところ、40℃付近から粒子径が急激に増大した。また、30℃から50℃の範囲で昇温・降温させてリポソーム懸濁液の透過率を測定したところ、昇温過程では透過率は減少し、降温過程では増加した。これは温度応答性高分子が温度変化により親水性から疎水性へと相転移しリポソームの性質が変化することで、膨張・凝集が起きたためと考えられる。温度応答性高分子の相転移温度以上・以下の温度で粒子径を繰り返し測定したところ、高温では粒子径が大きくなるが低温では小さくなることが確認され、粒子径変化の可逆性が維持されていることが分かった(Fig. 2(a))。また、リポソームの細胞への取り込みを各温度で観察したところ、温度変化による細胞内取り込みの違いが確認された(Fig. 2(b))。以上の結果から、本研究で作製した温度応答性高分子修飾リポソームは温度に応答して可逆的な性質変化を示すことから、それに伴う薬物放出制御、細胞内取り込み制御の可能性が期待される。

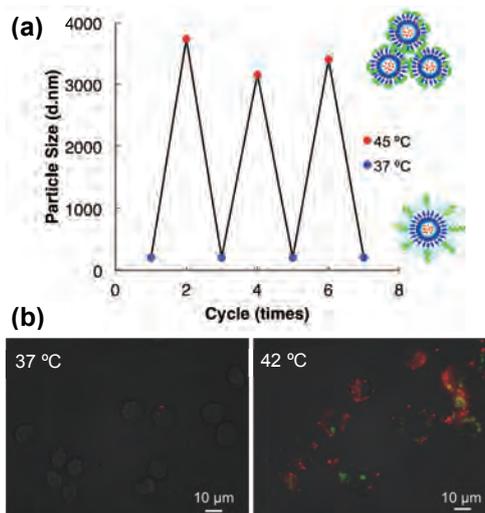


Fig. 2. Reversible particle size changes of liposomes (a) and temperature dependent cellular uptake of liposomes (b).

Development of Functional Liposome for Reversible Property Changes

Kei Fujieda, Ryo Nemoto, Eri Ayano, Kenichi Nagase, Yoshie Maitani, Hideko Kanazawa

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University

Tel & Fax: +81-3-5400-1378, E-mail: nagase-ken@pha.keio.ac.jp, kanazawa-hd@pha.keio.ac.jp

多糖のゾル-ゲル転移を利用した温度応答性マイクロ粒子の開発

¹東京農工大学大学院工学府応用化学専攻
○佐藤 拓未¹, 村上 義彦¹

【緒言】薬物治療においては、標的部位をターゲティングすることによって最低限の薬物量で最大限の治療効果を得ることが理想的である。そこで、薬物をキャリアに内包し、生体内での動きを精密に制御する研究が広く行われている。薬物キャリアは、①生体適合性が高いこと、②送達経路に適した粒子径を有していること、③薬物放出能（速効性または徐放性）を有していることが求められ、一般には高分子が素材として用いられる。天然高分子である多糖の一部は、固有の温度において、ゲルからゾル、ゾルからゲルに状態変化する現象（ゾル-ゲル転移）を示す。この現象を利用し、親水性物質が溶解した多糖水溶液と、界面活性剤が溶解した有機溶媒から調製した w/o エマルジョンを冷却することによって、分散相である多糖水溶液がゲル化し粒子を形成すると考えられる。本研究は、「多糖の性質を粒子の形成、および温度に応答した薬物放出に巧みに利用する」という独自の材料設計アプローチによって調製される新奇の薬物キャリアの開発を目的とした。

【実験】 κ -カラギーナン (5.0 w/v%) および塩化カリウム (32 mM) を用いて調製したゲル (0.3 g) を 80°C で静置することによってゾル状態にした。さらに、トルエン (10 mL) と界面活性剤を混合 (80°C) することによって有機溶媒を調製した。これらの溶液を高速攪拌 (80°C、16,000 rpm、10 min) することによって w/o エマルジョンを調製し、水浴中で冷却することによって s/o サスペンションを調製した。得られた s/o サスペンションを自然乾燥することによって粒子を形成した。得られた粒子について、SEM を用いた表面形態の観察および幾何学径の算出、模擬肺を用いた *in vitro* 吸引試験によるエアロゾル特性の評価、FITC-dex の内包および放出挙動の評価を検討した。

【結果と考察】高分子界面活性剤として poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (PEG-*b*-PCL, PEG M_n : 3,500, PCL M_n : 6,000) を用いた場合に高い安定性を示す s/o サスペンション、および約 4 μm の幾何学径を有する表面が凹凸状の粒子が得られた。球形の粒子の形成には、①高分子界面活性剤が粒子に配向し有機溶媒と明確な界面が作られること、②粒子の内部構造の安定性が高いこと、の二つが重要な因子である。吸引試験の結果から FPF 値が 52.1 \pm 7.8% となり、本粒子は高い肺送達能を有している可能性が示された。これは、粒子の表面形態に由来していると考えられる。さらに、FITC-dex の放出試験の結果から 5 分後にほぼ全ての内包物が放出されているため、本粒子は体内付着後に内包物を迅速に放出できる可能性が示された。

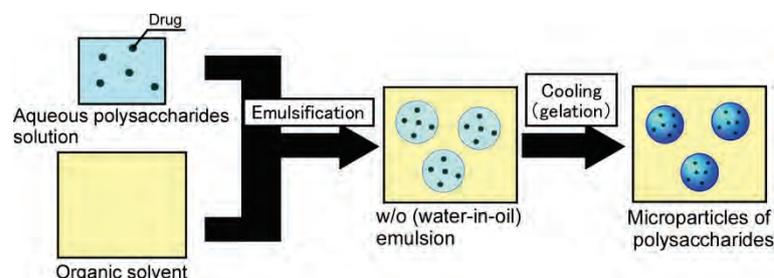


Fig. 1 Formation of temperature-responsive polysaccharides microparticles.

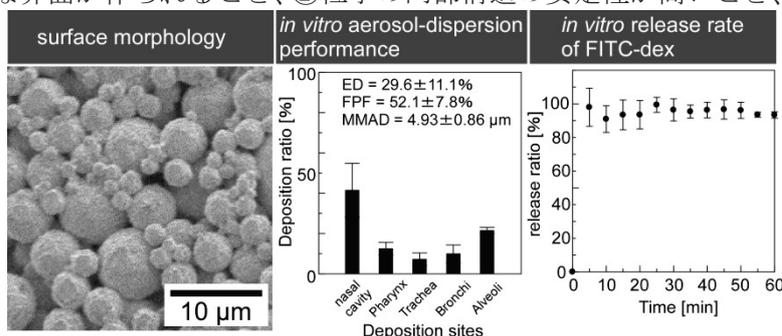


Fig. 2 Physical properties of κ -carrageenan particles.

Development of temperature-responsive microparticles formed via sol-gel transition.

Takumi SATO¹, Yoshihiko MURAKAMI¹

¹Department 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

液晶性部位を有するケラチンナノ粒子作製と機能化

慶應義塾大学大学院理工学研究科

○伊藤 香, 福井 有香, 藤本 啓二

【緒言】ケラチンは羽毛、羊毛、毛髪、皮膚、爪など生体中に存在する繊維状タンパク質であり、保水性・抗菌性・生体適合性などの特性を有することからバイオベースポリマーとして注目されている。本研究では、羊毛由来のケラチンを用いてナノ粒子を作製し、内部改質による機能化を試みた。すなわち、液晶性を有する 2 本鎖型カチオン界面活性剤とケラチン鎖とのイオンコンプレックス形成と疎水性会合によるポリマー鎖の集積化によってナノ粒子形成を行った。得られたナノ粒子の内部には、界面活性剤由来の液晶領域が形成されることから、ゲル-液晶相転移(液晶性)による膨潤収縮などの物性発現とそれに伴う物質の封入・放出といった機能発現が期待できる。さらに、ケラチン由来のチオール基と金との親和性を利用して、粒子内に金ナノ粒子(AuNPs)の生成を行い、プラズモン特性を利用した発色、センシング能など機能発現を行った。

【実験】繊維状の羊毛由来ケラチンに変性剤と還元剤を添加し、水素結合とジスルフィド結合の切断によって可溶化を行った。次に、カチオン界面活性剤である Diocetadecyl dimethyl ammonium chloride (DODAC)をケラチン溶液(pH 12)に加え、複合体の形成と集積化を利用して粒子を作製した(Ker-DODAC)。この粒子に酸化剤を添加し、ジスルフィド形成による粒子内架橋を施した(Ker-DODACss)。得られた粒子について種々の pH と温度において、散乱強度測定による粒子の安定性評価と水中粒径測定を行った。また、粒子に疎水性蛍光プローブである 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS)を封入し、界面活性剤に由来する疎水場の形成とゲル-液晶相転移挙動の検出を試みた。さらに、封入した ANS について温度変化による放出挙動の検討を行った。次に、Ker-DODAC に HAuCl₄ 溶液を添加し、*in situ* 還元を促すことで金複合化を試みた(Ker-DODAC-Au)。得られた粒子について透過型電子顕微鏡(TEM)による形状観察と金含有率の算出を行った。さらに、散乱強度と水中粒径測定によって環境応答性と安定性の評価を行った。

【結果と考察】粒径約 100 nm で、表面電位が-36 mV(pH 12)の Ker-DODAC が得られた。この粒子は、pH 7.4 以上では安定に分散状態を維持したが、pH 5.0 以下では DODAC が脱着することで崩壊がみられた。ジスルフィド架橋を行った Ker-DODACss では、広い pH 領域において粒子形状と分散状態が維持された。これらの粒子内には DODAC 由来の疎水場の形成が確認され、ゲル-液晶相転移に伴い、昇温により疎水場が減少し、降温により上昇した。これに伴って、昇温すると粒子は膨潤し、降温すると収縮した。さらに、昇温による膨潤によって封入物質の放出を促進させることができた。この際、ジスルフィド架橋によって、DODAC の漏出が抑制された。次に、粒子内において金の生成を行ったところ、15~40 nm の球状 AuNPs が得られた。さらに、pH、還元剤の種類と濃度、HAuCl₄濃度などを変化させることにより、サイズと金含有率を調節することができた。得られた Ker-DODAC-Au は、Ker-DODAC が崩壊する環境条件でも分散状態を維持することがわかった。これは、ケラチン鎖が AuNPs によって架橋(金属架橋)されたことによると考えている。

Design and Synthesis of Keratin Nanoparticles Including Liquid Crystals and Gold Nanoparticles

Kaori ITO, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO

Graduate School of Science and Technology, Keio University

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

薬物徐放化技術を活用した組織修復性マクロファージの体内誘導

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
○百鳥 直樹, 田中 隆介, 田畑 泰彦

【緒言】本研究の目的は、体内局所に組織修復性マクロファージを集積させ、組織の再生修復を促す材料を開発することである。マクロファージには、炎症性と抗炎症性の2つの性質をもつサブタイプの存在が知られている。その中で抗炎症性マクロファージは炎症を抑制し、生体組織を修復へと導く作用をもっている。そこで、血中の単球を必要部位へ移動させ、その部位でマクロファージを抗炎症性へと変換させることができれば、生体組織修復を促すことができるであろう。本研究では、単球移動活性をもつ薬物の SEW2871 (SEW)、および抗炎症性マクロファージへの変換作用をもつ薬物の pioglitazone (pio) を取り上げた (図 1)。これらの2種類の薬物を徐放化できる材料を調製、その徐放挙動と細胞への作用を調べた。

【実験】ゼラチンのアミノ基にコレステリル基を化学導入した疎水性ゼラチンを作製した。この疎水性ゼラチンと難水溶性の SEW を共通溶媒であるジメチルスルホキシド中に溶解させてから、蒸留水に対して透析を行うことで SEW 水可溶性ゼラチンミセルを作製した (SEW-ミセル)。SEW-ミセルの *in vitro* でのマウス骨髄由来単球の移動活性を、SEW 単体による作用と比較した。pio のジクロロメタン溶液に乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) を加え、溶解させた。調製した溶液をポリビニルアルコール (PVA) 水溶液中に分散させ、溶液を攪拌状態に保ちジクロロメタンを揮発させた後、遠心分離を行い、pio 内包 PLGA 粒子 (pio-粒子) を得た。種々の大きさの pio-粒子をマウス骨髄由来マクロファージとともに培養し、抗炎症性マクロファージの指標であるインターロイキン-10 (IL-10) 産生とアルギナーゼ活性を測定した。

SEW-ミセルおよび pio-粒子を組み込んだゼラチンハイドロゲルを調製した。調製した薬物内包ハイドロゲルからの SEW と pio の徐放を *in vitro* で評価した。

【結果と考察】ゼラチンとコレステロールの仕込み比を変化させることによってコレステリル基の導入率を変化させることができた。疎水性ゼラチンと SEW の仕込み比を変化させると、ミセルの SEW 内包量が変化した。SEW-ミセルは SEW 単体と同程度の単球移動活性をもつことがわかった。

PVA 水溶液への PLGA および pio のジクロロメタン溶液の投入方法を変えることで、平均粒径が約 300 nm の pio-粒子 (pio 内包ナノ粒子) と約 160 μm の pio-粒子 (pio 内包マイクロ粒子) を作製した。pio 内包ナノ粒子とともに培養されたマクロファージの IL-10 産生 (図 2) とアルギナーゼ活性は、未処理の細胞に比べて、有意に高くなった。これは、pio 内包ナノ粒子がマクロファージに取り込まれ、pio がマクロファージに効率的に作用したためであると考えられる。

作製した薬物内包ハイドロゲルからの SEW と pio の徐放を確認した。

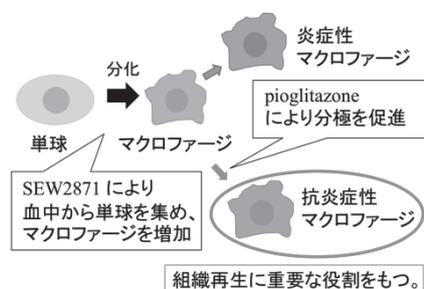


図 1. 抗炎症性マクロファージ動員スキーム

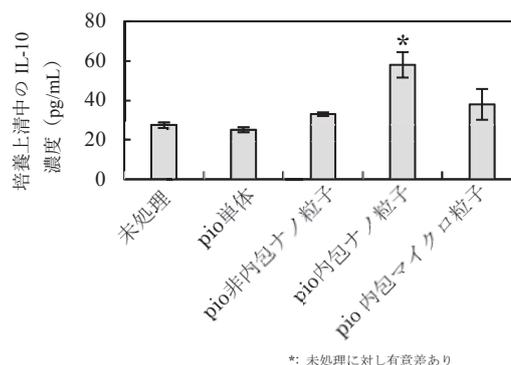


図 2. マクロファージからの IL-10 産生

Biomaterials: In vivo induction of anti-inflammatory macrophages by utilizing drug delivery technology

Naoki MOMOTORI, Ryusuke TANAKA, and Yasuhiko TABATA

Institute for Frontier Life and Medical Science, Kyoto University, Kyoto 606-8397, Japan

Tel: +81-075-751-4867, Fax: +81-075-751-4646, e-mail: momotori.naoki.36u@st.kyoto-u.ac.jp

がん細胞を標的とした高機能化タンパク質ナノ粒子による DDS システムの構築

東京工業大学生命理工学院

○矢渕 翼, 池田 裕介, 眞下 泰正, 三重 正和, 小島 英理

【緒言】ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、体内における薬物動態を制御するシステムであり、DDS により標的部位への親和性を付与することで薬物投与の最適化が可能となる。近年では、優れた生体適合性に加え、体内で不安定な薬剤を安定化する機能等を有する生体高分子のキャリア (運搬体) の研究が盛んに行われている。細胞外マトリックスの一種であるエラスチンタンパク質をモデルとしたペプチド (Elastin-like polypeptide : ELP) は、高い生体適合性や生体内における安定性、その疎水性領域に薬剤を内包することが可能であることから、DDS キャリアへの応用が期待されている。さらにこの ELP は、相転移温度を超えると構造を変化させ、巨大な凝集塊を形成する温度応答性を有する。当研究室では先行研究として ELP の疎水性ドメインをモチーフとした温度応答性ペプチド (AVGVP)_n と負電荷を有するアミノ酸であるアスパラギン酸のポリペプチドの融合タンパク質を作製した。この融合タンパク質は、ELP の性質による温度に応答して凝集体を形成する際に、ポリアスパラギン酸の静電反発力を利用することで、凝集体のサイズおよび分子配向が制御されたナノ粒子を形成する。本研究では、がん細胞への特異的なデリバリーを目的として、このナノ粒子表面に、がん細胞への標的能と細胞内部移行能を有するペプチドを提示したタンパク質ナノ粒子を構築した。ここでは、細胞接着配列 RGD と組織透過性配列 CendR を組み合わせた環状ペプチド iRGD を遺伝子工学的に ELP とポリアスパラギン酸の融合タンパク質に融合し、高機能タンパク質ナノ粒子を作製した。また、ナノ粒子の物性評価および抗がん剤を内包させたナノ粒子の *in vitro* での有効性を評価した。

【実験】ナノ粒子を構成する ELP とポリアスパラギン酸の融合タンパク質に iRGD を付加したタンパク質 ((AVGVP)₄₂-D44-GGGS2-iRGD) を遺伝子工学的に作製した。作製したタンパク質において、濁度測定および DLS による粒子径測定を行うことで、このタンパク質の相転移等の物性や粒子形成能を評価した。また、ナノ粒子に蛍光物質である coumarin6 (C-6) を内包させ、細胞に添加し、添加後の細胞において共焦点顕微鏡もしくは蛍光顕微鏡を用いて細胞の蛍光を観察することで、がん細胞への特異的な結合さらには細胞内導入を評価した。さらに、ナノ粒子に疎水性の抗がん剤である paclitaxel (PTX) を内包し、がん細胞に添加後、一定時間経過した細胞において Calcein-AM と propidium iodide による細胞染色を行うことで、生細胞数と死細胞数を評価した。加えて、CCK-8 を用いた定量的評価も行った。

【結果と考察】作製したタンパク質は、濁度測定の結果、昇温過程において特定の温度を境に濁度が上昇し、温度応答性を有することが確認された。相転移温度は 38.2°C であり、生体温度付近であった。また、降温過程では濁度がほとんど降下せず、構造変化が不可逆的であり、形成された粒子が構造安定性を保持していることが示された。DLS を用いて粒子径測定を行った結果、加熱後 30nm 前後の粒子を形成していることが明らかとなり、DDS のキャリアとして適切なサイズのナノ粒子を形成することが分かった。また、ポリアスパラギン酸の静電反発力により際限のない凝集を抑えているといえる。ナノ粒子の細胞内導入評価においては、作製したナノ粒子のがん細胞内部移行能が確認できた。コントロールである iRGD を提示していないナノ粒子は細胞に取り込まれておらず、また、iRGD を提示したナノ粒子でも非がん細胞には取り込まれなかったことから、がん細胞に特異的に導入可能であることが示された。さらに、作製したナノ粒子に PTX を内包させることで、がん細胞に特異的に作用し、細胞死を誘導できることが明らかとなった。

Construction of highly functionalized protein nanoparticles for targeting cancer cells

Tsubasa YABUCHI, Yusuke IKEDA, Yasumasa MASHIMO, Masayasu MIE, Eiry KOBATAKE

School of Life science and Technology, Tokyo Institute of Technology

Tel: +81-045-924-5760, Fax: +81-045-924-5779, E-mail: kobatake.e.aa@m.titech.ac.jp

卵白アルブミン分泌シグナルペプチドが形成するナノ粒子によるアミロイド線維形成抑制

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 ○和田愛以・和久友則・田中直毅

【緒言】 アルツハイマー病は、細胞外におけるアミロイドβ (Aβ) の異常凝集が誘導する神経細胞死によって引き起こされる。細胞毒性の主な原因とされる水溶性 Aβオリゴマーの生成を抑制することができれば、アルツハイマー病の予防や治療に有効であると期待される。我々は、卵白タンパク質の主成分であるオボアルブミン (OVA) の N 末端領域の分泌シグナルペプチド (pN₁₋₂₂ (acetyl-GSIGAASMEFCFDVFKELKVHH)) に着目した。OVA は、細胞内輸送を受け細胞外に放出される分泌タンパク質の一種である。通常、分泌タンパク質のシグナルペプチドは細胞外に分泌される過程で切断されるが、OVA のシグナルペプチドは切断されずに N 末端領域に存在する。OVA を酸性条件下でペプシン処理すると、N 末端 22-23 残基目の間で特異的な加水分解を受けて、pN₁₋₂₂ ペプチドが得られる。

本研究では、pN₁₋₂₂ ペプチドから成るナノ会合体を作製し、得られたナノ会合体が Aβ の異常凝集に与える影響について評価した。

【実験】 pN₁₋₂₂ ペプチドをリン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) 中、65°C で 1 時間加熱することでナノ会合体を作製した。その形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察し、表面電荷をゼータ電位測定により評価した。種々の濃度の pN₁₋₂₂ ナノ会合体存在下、Aβ₁₋₄₂ の異常凝集の挙動をチオフラビン T (ThT) 蛍光アッセイにより評価した。

【結果と考察】 作製した pN₁₋₂₂ ナノ粒子は、直径 20 - 25 nm の球状の形態をもつことを TEM により確認した。また表面電荷は、-21.95 mV であった。pN₁₋₂₂ ナノ粒子共存下での Aβ₁₋₄₂ の凝集過程を ThT 蛍光アッセイにより評価した (Fig. 1)。pN₁₋₂₂ ナノ粒子存在下では、Aβ₁₋₄₂ 単独に比べて蛍光強度の立ち上がりまでに要する時間が、pN₁₋₂₂ ナノ粒子の濃度依存的に増加した。さらに Aβ₁₋₄₂ の凝集過程を TEM によっても観察したところ、Aβ₁₋₄₂ 単独では 3 h より線維化が認められたのに対して、pN₁₋₂₂ ナノ粒子存在下では 5 h まで線維の形成が認められなかった。以上より pN₁₋₂₂ ナノ粒子が Aβ₁₋₄₂ の凝集を確かに抑制していることが確認された。当日はネットチャージの異なる pN₁₋₂₂ 改変ペプチドの会合体形成挙動及び、その Aβ₁₋₄₂ の凝集抑制能についても報告する。

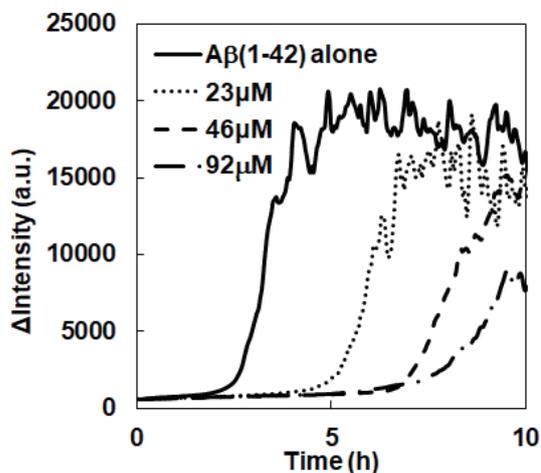


Figure. 1 Time course of ThT fluorescence intensity of 23 μ M A β ₁₋₄₂ solutions in the presence of pN₁₋₂₂ nanoparticles (0-92 μ M).

Prevention of amyloid fibril formation with nano-assembly formed from signal peptides of ovalbumin.
 Mei WADA, Tomonori WAKU and Naoki TANAKA (Faculty of Molecular Chemistry and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan)
 Tel: +81-75-724-7861, Fax: +81-75-724-7861, E-mail: tanaka@kit.ac.jp

Benzoboroxole 含有ポリマーによる HVJ-E 表面修飾法の開発

¹東京工業大学 環境・社会理工学院 融合理工学系, ²物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点, ³筑波大学大学院 数理工学科学研究科, ⁴東京理科大学大学院 基礎工学研究科, ⁵東京工業大学 科学技術創生院 先端原子力研究所
○米岡 修一郎¹, 中川 泰宏^{2,3}, 荏原 充宏^{2,3,4}, 塚原 剛彦⁵

【緒言】 HVJ-E(Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope)は膜融合作用や抗腫瘍免疫活性化作用を有することから、有用な非ウイルス性ベクターとして期待されている。一方、HVJ-Eには、赤血球に膜融合して溶血を引き起こしてしまうことや、抗腫瘍免疫単独ではガンの根治が難しいことなど、課題が残っている。そこで近年、ポリマー性素材でHVJ-Eを被覆する研究や、BNCT(ホウ素中性子捕捉療法)等の他のガン治療法と組み合わせる研究が盛んに進められている。本研究では、膜融合作用を制御する機能と、BNCT用ホウ素薬剤の機能を併せ持つ新規材料の開発を目的とした。具体的には、pHに応答して糖に結合・解離する性質を有し、かつ、ホウ素原子を有するMAAmBO(methacrylamido benzoboroxole)を含む生体親和性ポリマーをHVJ-Eに被覆すると共に、その特性を評価する。MAAmBOは、中性(pH約7.4)の血中ではHVJ-E表面の糖鎖に結合し、HVJ-Eがポリマーによって被覆されることで溶血が抑制される一方、酸性(pH3~5)のガン組織中ではMAAmBOと糖鎖の結合が解離し、ポリマーが脱離するため、HVJ-Eの膜融合作用が発現する(Fig.1)。MAAmBOはホウ素原子を含むため、BNCT薬剤としての役割を果たすことも可能となる。

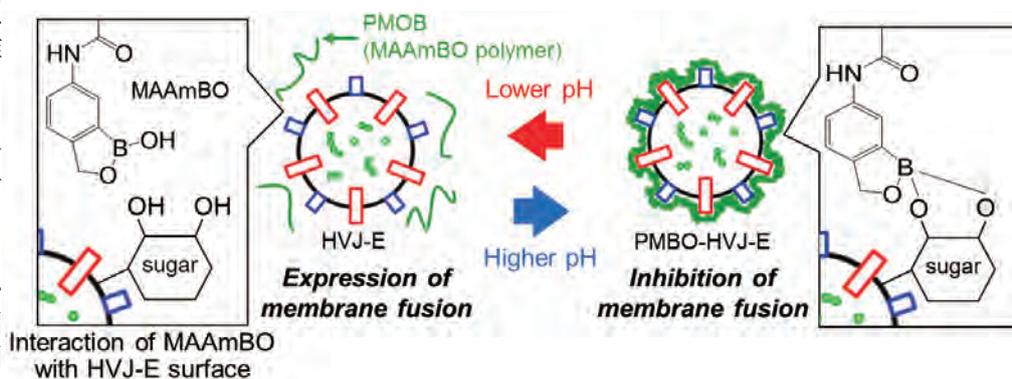


Figure.1: Modification of MAAmBO containing polymer on HVJ-E surface

【実験】 MPC(2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)とMAAmBOの共重合ポリマーPMBO(poly[MPC-co-MAAmBO])を精密ラジカル重合法により合成し、末端を蛍光修飾してPMBO(F)とした。これをpH6.0, 7.4, 8.0にそれぞれ調整したリン酸バッファー(PBS)に溶解させ、PMBO(F)溶液を作成した。HVJ-Eも同じpHにそれぞれ調整したPBSに分散させた。同じpHのPMBO(F)溶液とHVJ-E分散液を混合して4℃で40分間攪拌し、HVJ-E表面をPMBO(F)で被覆してPMBO(F)-HVJ-Eとした。その後、pH7.4及び8.0のPMBO(F)-HVJ-E分散液は、遠心濾過によってPBSを除き、新たにpH6.0のPBSを加えてPMBO(F)を脱離させた。それぞれの被覆・脱離状態は蛍光スペクトルにより評価した。また、同様の手順を用いてPMBOを修飾されたHVJ-EをpH7.4のPBSにて作成してPMBO-HVJ-E分散液とした。その後、ニワトリ血液と混合して37℃にて2時間インキュベート後、上澄み液の540nmにおける吸光度をUV-Vis分光装置で測定し、溶血の有無を判断した。

【結果と考察】 蛍光スペクトルから、HVJ-E表面へのPMBO(F)の修飾はpH7.4以上で起こることを確認した。また、pH7.4及び8.0のPMBO(F)-HVJ-E分散液をpH6.0とするとPMBO(F)が脱離されることも確認した。溶血試験では、溶液のポリマー濃度が増加することによって溶血が抑制される傾向が確認された。今後、より詳細なポリマー濃度依存性を評価する予定である。

Development of HVJ-E surface modification technique utilizing benzoboroxole-containing polymer

Shuichiro Yoneoka¹, Yasuhiro Nakagawa^{2,3}, Mitsuhiro Ebara^{2,3,4}, Takehiko Tsukahara⁵

¹Tokyo Tech. Sch. of Environment and Society Dep. of Transdisciplinary Sci. and Engineering, ²NIMS. MANA., ³Tsukuba Univ. Faculty of Pure and Applied Sci., ⁴Tokyo Univ. of Sci. Graduate Sch. of Industrial Sci. and Tech., ⁵Tokyo Tech. Institute of Innovative Research. LANE.

Tel, Fax: +81-3-5734-3067, E-mail: ptsuka@lane.iir.titech.ac.jp

血清アルブミン認識空間を有する分子インプリントナノゲルの生細胞 取り込み挙動

¹神戸大学大学院工学研究科

○早川 なつき¹, 山田 託也¹, 北山 雄己哉¹, 竹内 俊文¹

【緒言】

ナノ粒子は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) や *in vivo* イメージングなど生体への応用が期待される機能性材料であり、生細胞に対するナノ粒子の相互作用解析は、ナノ粒子の生体応用において重要な知見である。我々はこれまでに、投与されたナノ材料が生体内において非オプソニンタンパク質であるアルブミンを認識し、後天的にステルス性を獲得する新しいナノキャリアとして分子インプリントポリマーナノゲル (MIP-NGs) を開発し、高い血中滞留性を示すことを明らかにし、また、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果に基づいて、腫瘍組織に蓄積することも明らかにした¹⁾。本研究ではこれまでに DDS キャリアとして開発を進めてきた MIP-NGs の生細胞に対する取り込み挙動の解析を試みた。

【実験】

N-Isopropylacrylamide, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, *N,N'*-methylenebisacrylamide, fluorescein acrylamide, pyrrolidyl acrylate を混合し、human serum albumin (HSA) を標的タンパク質、V-50 を開始剤、10 mM phosphate buffered saline (pH7.4) を溶媒として用い無乳化剤沈殿重合によって MIP-NGs を作製した。得られた MIP-NGs はサイズ排除カラムクロマトグラフィおよび限外ろ過を用いて精製した。胃がん細胞株 FU97 を培養し、まず MIP-NGs の細胞毒性を検討した。5% CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 24 時間培養した FU97 に MIP-NGs を添加し、24 時間後に生存率の測定を行った。播種した FU97 に MIP-NGs を 25 µg/mL になるように加え、24 時間静置した後、各種トラッキング試薬を添加し細胞小器官を染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) で得られた画像から共局在係数を算出することで、細胞中における MIP-NGs の局在箇所を解析した。さらに、播種した FU97 を無血清培地で洗浄し、各種阻害剤とともに MIP-NGs を添加し 3 時間静置した後、CLSM で観察することで、取り込み機構解析を行った。最後に HSA の MIP-NGs の細胞内取り込みへの影響について検討した。MIP-NGs と HSA を 37°C で 1 時間インキュベートした後、無血清培地で洗浄した FU97 に様々な濃度の HSA と共に添加し 3 時間静置した。フローサイトメトリーにて蛍光強度を測定し、各条件での MIP-NGs の細胞内取り込みを比較した。

【結果と考察】

MIP-NGs の FU97 に対する細胞毒性試験を行ったところ、粒子濃度 174 µg/mL でも生存率がほぼ 100% となり、細胞毒性が低いことが示された。MIP-NGs を FU97 に添加し、リソソームおよびミトコンドリア染色試薬と同時染色すると、リソソーム染色試薬と高い共局在係数を示すことから、リソソームに局在することがわかった。また細胞機能が停止しエンドサイトーシスが起らない 4°C において MIP-NGs を添加したところ、細胞内蛍光が観察されなかったことから、粒子が細胞に取り込まれる機構はエンドサイトーシスであることが示された。さらにエンドサイトーシス阻害剤を添加して、MIP-NGs の取り込み挙動を観察したところ、MIP-NGs の主な細胞取り込み機構は、カベオラ・脂質ラフト媒介エンドサイトーシスであることが確認された。また、HSA の存在下で MIP-NGs を添加すると HSA 濃度が高くなるにつれて MIP-NGs の細胞内蛍光強度が減少することが明らかになり、HSA 濃度に依存して MIP-NGs の細胞取り込み量が増加することを明らかにした。

【参考文献】

(1) Takeuchi, T. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 7088-7092 (2017)

Cellar uptake of albumin-imprinted nanogels into living cells

Natsuki Hayakawa¹, Takuya Yamada¹, Yukiya Kitayama¹, Toshifumi Takeuchi¹

¹ Graduate School of Engineering, Kobe University

Tel: +81-78-803-6158, Fax: +81-78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

EGCG-Modified Nanoparticle for Apoptosis

O Gan Ning¹, Tooru Ooya¹

¹ Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University

[Introduction]

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, while most available therapeutic methods have formidable disadvantages. Nanoparticles (NPs) have been extensively studied as drug carriers for cancer therapy. Among them, gold NPs (AuNPs) have been widely put a high value, owing to properties such as non-reactive, versatility in surface modification, delivery to cancer cells due to the enhanced permeation and retention (EPR) effect, and easy removal from human body. Epigallocatechin gallate (EGCG), the major component in tea polyphenols, has been reported to possess anti-cancer effects. In addition, EGCG can specifically bind to the 67 kDa laminin receptor that is overexpressed in some cancer cells. However, the high concentration of EGCG was required to induce the cancer cell death. In this study, EGCG-AuNPs with different sizes were prepared to increase the local concentration of EGCG. Their cytotoxicities toward the cultured cancer cells were evaluated to discuss the effect of EGCG-AuNPs.

[Experimental]

EGCG was dissolved in DI water (9 ml) and stirred continuously at continuously at 30°C for 15 min. Then, 1 ml of H₂AuCl₄·H₂O solution with different concentration was added dropwise into the EGCG solution under stirring, followed by 2 h stirring at 30°C. Then, the solution was centrifuged for 30 min (20,000 rpm), washed by water and acetate buffer (0.1 M, pH=5), and re-dispersed in the acetate buffer. The samples were sonicated for 1h, and then stored at 4 °C. Amount of EGCG in EGCG-AuNPs was determined by Folin-Ciocalteu reagent (FCR) method. The obtained EGCG-AuNPs were analyzed by UV-vis spectra and dynamic light scattering (DLS).

HeLa and NIH3T3 cells (passage more than 3 times) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) at 37°C in a humidified 95% air/5% CO₂ incubator. The cell viability in the presence of EGCG-AuNPs was tested by the CCK-8 assay.

[Results and Discussions]

EGCG-AuNPs with different ratio of EGCG and Au were successfully prepared. As the concentration of EGCG increased, the color of EGCG-AuNPs changed from red to blue, while the sizes almost shown no increase before $n_{\text{EGCG}}:n_{\text{Au}}$ reached 5:1 (70 nm). This means that the size of EGCG-AuNPs could be modulated by the feed ratio. The cell viability of EGCG-AuNPs was compared with EGCG itself. Greater cytotoxicity of EGCG-AuNPs than EGCG at the same concentration against HeLa cells was obtained, suggesting that the increased local concentration of EGCG increased the cytotoxicity. Furthermore, small-sized EGCG-AuNPs exhibited the increased cytotoxicity, suggesting the size-dependent cytotoxicity. The cytotoxicity study toward NIH3T3 cells was also carried out, and we will report them in this presentation.

EGCG-Modified Nanoparticle for Apoptosis

Gan Ning¹, 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

薬物徐放・組織接着材料への応用を目指した tetraPEG-高分子ミセル複合化ゲル

¹東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○小川 雅人¹, 村上 義彦¹

【緒言】

薬物の効果を最大限に発現するためには、薬物の血中濃度を所望の濃度に保つ必要がある。また、近年、止血材、癒着防止材、薬物徐放デバイスなどへ応用可能な材料として、生体組織に接着する材料（組織接着材料）が注目されており、現在までにさまざまな組織接着材料が開発されている。しかし、現状では、生体適合性、安全性、薬物徐放性を全て満たす組織接着材料の報告例は少ない。そこで、本研究では、生体適合性が高く均一な網目構造を有する tetraPEG ゲルに薬物の内包・徐放機能を有する表面アルデヒド化高分子ミセルを組み込んだ、tetraPEG-高分子ミセル複合化ゲルの開発を検討した。

【実験】

モデル薬物として蛍光物質であるローダミン B (RhB) を内包した、ポリエチレングリコール (PEG) -*b*-ポリ乳酸 (PLA) ブロック共重合体 (分子量 PEG2800-PLA2900, PEG3490-PLA6260) が形成する表面アルデヒド化高分子ミセルを調製した (濃度: 0.03 mM)。Carmody 広域緩衝液 (pH 8) に溶解した末端に *N*-ヒドロキシスクシンイミド基を有する tetraPEG (tetraPEG-NHS, 分子量 20,000, 40,000, 濃度 2.5 mM) を RhB 内包高分子ミセル水溶液と混合した。この混合溶液と、あらかじめ Carmody 広域緩衝液 (pH 8) に溶解した末端にアミノ基を有する tetraPEG (tetraPEG-NH₂, 分子量 20,000, 40,000, 濃度 2.5 mM) を混合し、ゲルを調製した。tetraPEG-NH₂ 水溶液、tetraPEG-NHS 水溶液、ミセル水溶液の体積比率は 2:1:1 とした。調製したゲルを透析膜に入れ、サンプル瓶内において 40 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対して透析した (温度 37°C, 透析時間 48 時間)。透析膜外の PBS を一定時間ごとに採取し、分光蛍光光度計を用いて RhB の放出量を求め、RhB の放出挙動を評価した。

【結果と考察】

tetraPEG の分子量の増加にともない、RhB の放出速度が低下した (Fig. 1)。また、tetraPEG の分子量が 20,000 の場合、ミセルを形成するブロック共重合体の PLA の分子量の増加にともない、RhB の放出速度が低下した。以上より、tetraPEG およびミセルを形成するブロック共重合体の分子量を変化させることにより、薬物の放出速度を調節可能であることが示唆された。

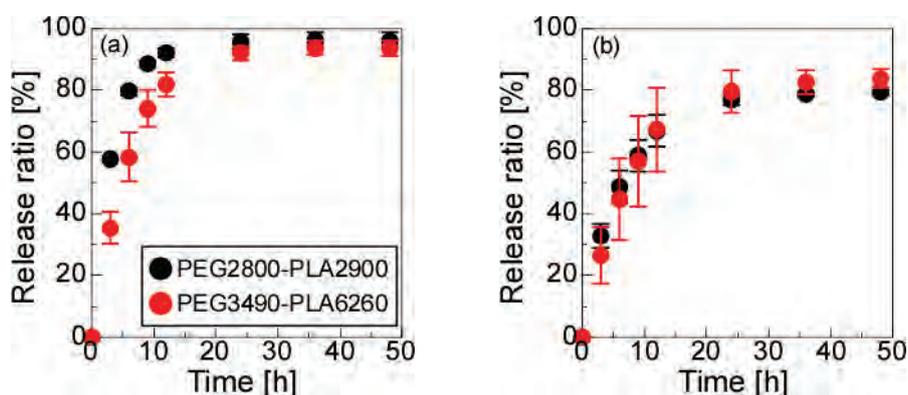


Fig. 1 Release behavior of RhB in tetraPEG-polymeric micelle hybrid gels
(The molecular weights of tetraPEG were (a) 20,000 and (b) 40,000)

Tissue-adhesive tetraPEG-polymeric micelle hybrid gel for sustained drug release

Masato Ogawa¹, Yoshihiko Murakami¹

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

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

経肺投与 DDS への応用を目指した新奇な多孔質 PLGA 粒子 ～薬物放出特性の評価～

¹東京農工大学 工学府 応用化学専攻
○高橋 勉¹, 村上 義彦¹

【緒言】

経肺投与法は薬物を吸入することで肺へ薬物を送達する手法であり、特異な構造を有する肺胞を利用するため薬物の吸収効率が高く、痛みをともしない、等の利点から、新たな投薬方法としての発展が期待されている。経肺投与に適した薬物キャリアは、適切な粒子径 (1~3 μm) を有し、粒子密度が低く、粒子表面の分子修飾が容易である、等の条件を満たす必要がある。しかし、これらの条件を全て満たす粒子の調製は困難であった。このような背景から、本研究室では、経肺投与 DDS への応用を目指して表面修飾マイクロ粒子の開発を検討してきた。その開発過程において、疎水性高分子 (粒子形成剤) および両親媒性ブロック共重合体 (界面活性剤) を溶解した有機溶媒と水を一段階のみ機械乳化し、液中乾燥することによって、多孔質粒子が偶然得られた⁽¹⁾。この多孔質粒子は前述の条件を満たすため、経肺投与用の薬物キャリアとして応用できる可能性が高い。本研究では、多孔質粒子にイミダゾール系抗真菌薬であるルリコナゾール (LLC) を内包し、両親媒性ブロック共重合体および粒子形成剤の組成や分子量が LLC 内包粒子の物性や薬物放出挙動に及ぼす影響を評価し、粒子からの薬物放出特性を制御することを検討した。

【実験】

両親媒性ブロック共重合体として末端メトキシ化ポリエチレングリコール-*b*-ポリ乳酸 (mPEG-PLA) を合成した。粒子形成剤として PLGA (ポリ乳酸-グリコール酸共重合体) または PLA、界面活性剤として mPEG-PLA または Tween85、疎水性薬物として LLC を用いて粒子を調製した。液中乾燥した後、遠心分離、純水洗浄、凍結乾燥を経て回収した粒子について、粒子の表面形態や空孔径、粒子径、内包率を評価した。界面活性剤の組成や種類、粒子形成剤の組成や分子量が粒子の物性に及ぼす影響を評価し、PBS 中における粒子の表面形態の経時変化を観察するとともに薬物放出挙動を評価した。

【結果と考察】

界面活性剤として mPEG8700-PLA7500 (4桁の数字は数平均分子量を表す) を用いた系では多孔質粒子が得られ、粒子形成剤の種類に依存せず同程度の空孔径、内包率を示した。一方、Tween85 を用いた系では無空孔粒子が得られ、内包率は多孔質粒子と同程度の値を示した。多孔質粒子は比表面積が大きいため、粒子形成剤の種類に依存せず PBS に分散して数時間で粒子表面の溶解が見られ、迅速な薬物放出を示した。無空孔粒子は収率が多孔質粒子の 1/4 程度と低く、形状を維持した粒子が 24 時間経過後でも観察されたが、経時変化にともない凹みを有する、または潰れた粒子が多くなった。また、多孔質粒子と比較して比表面積が小さいため、初期バースト放出が抑えられた。本多孔質粒子は吸引試験において高い肺送達能を示しており、制御可能な薬物放出機能を付与することによって、経肺投与による治療が期待される様々な病気に対して応用できる可能性がある。

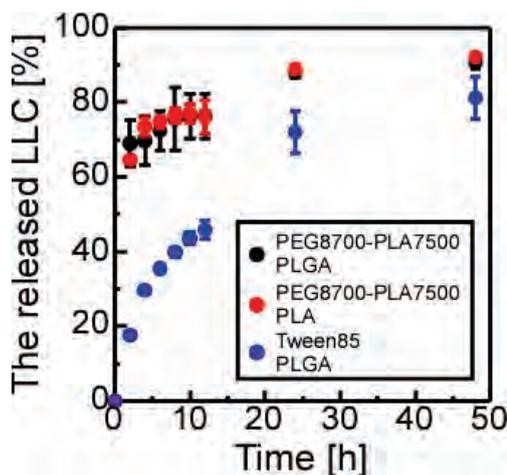


Fig. 1 The effect of surfactants and particle forming agents on the release of LLC from the particles

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

Development of novel porous particles for pulmonary DDS –evaluation of drug release-

Tsutomu TAKAHASHI¹, Yoshihiko MURAKAMI¹

¹Development 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

抗がん剤含有高分子ナノ粒子-血小板ハイブリッド DDS のデザイン

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
○城 潤一郎, 明石 祐典, 田畑 泰彦

【緒言】

血小板は、体内の異常部位へ集積し、刺激に対して適切な生理活性物質を分泌することで生体の恒常性を保っている。この血小板をドラッグキャリアとして用いることができれば、血小板の持つ異常部位集積能力を活用したドラッグデリバリーが可能となるであろう。そこで本研究では、血小板とドラッグを組み合わせた DDS (血小板ハイブリッド DDS) の構築を目指した。血小板ハイブリッド DDS の構築には、血小板を凝集させずにドラッグと血小板を混合する技術、方法論の開発が必要である。本研究では、難水溶性抗がん剤を内包した乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子を調製、それを血小板と混合した。混合時での血小板凝集に与える PLGA ナノ粒子の物理化学的性質の影響を調べるとともに、抗がん剤内包 PLGA ナノ粒子との混合で調製した血小板ハイブリッドの抗がん活性を調べた。

【実験】

PLGA (乳酸:グリコール酸=50:50、重量平均分子量:20,000) をアセトンに溶解させ、一方、抗がん剤のパクリタキセル (PAC) をエタノールに溶解させた。この2つの溶液の混合した後、種々の界面活性高分子を含む水溶液中へ滴下し乳化させた。用いた界面活性高分子は、ポリビニルアルコール (PVA, 鹼化度 86-90%, 重合度 1,000、日本酢ビ・ポバール株式会社から供与)、ゼラチン (重量平均分子量:10,000、等電点 5.0 (Ge15) あるいは 9.0 (Ge19)、新田ゼラチン株式会社から供与)、あるいはスペルミン導入ゼラチン (スペルミン導入率:1 (Spe-Ge11)、2 (Spe-Ge12)、および 4% (mole/mole) (Spe-Ge14)) である。それぞれの乳化液を攪拌しながら有機溶媒を蒸発させ、PAC を内包した PLGA ナノ粒子 (PAC-PLGA ナノ粒子) を得た。PLGA および PAC 濃度、界面活性高分子の種類、ならびに攪拌速度を変化させることにより、異なる PAC-PLGA ナノ粒子を作製した。次に、常法にて C57BL/6 マウス (15 週令、オス) より血小板を単離、タイロド緩衝液中に懸濁させた。この血小板懸濁液と PLGA ナノ粒子のリン酸緩衝生理食塩水の懸濁液とを 37°C で混合した。混合液の濁度の時間変化から血小板の凝集挙動を調べた。また、PAC-PLGA ナノ粒子と 37°C、2 時間混合した後の血小板中の PAC 量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。加えて、PAC を含む血小板ハイブリッドをがん細胞とともに培養し、がん細胞の増殖挙動を評価した。

【結果と考察】

Spe-Ge1 を用いて作製した正電荷表面をもつ PLGA ナノ粒子は、血小板を凝集させたが、Ge15、Ge19、および PVA で作製した負電荷表面をもつ PLGA ナノ粒子では、血小板は凝集しなかった。これは、PLGA ナノ粒子の正電荷が負電荷表面をもつ血小板と強く相互作用したため、凝集の程度が高まったと考えられる。凝集が見られなかった PAC-PLGA 粒子と血小板との混合物には、PAC が含まれていた。PAC を含む血小板ハイブリッドは、PAC-PLGA 粒子と比較してがん細胞の増殖を有意に阻害した。これは、PAC-PLGA ナノ粒子が血小板とハイブリットされることによって、がん細胞へより多く取り込まれ、細胞内で PAC を放出することによって、増殖抑制に寄与したためと考えられる。

Design of drug loaded polymer nanospheres-platelet hybrid DDS

Jun-ichiro Jo, Yusuke Akashi, Yasuhiko Tabata

Laboratory of Biomaterials, Department of Regeneration Science and Engineering, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Tel: +81-75-751-4108, Fax: +81-75-751-4646, E-mail: jo@infront.kyoto-u.ac.jp

脂肪酸修飾 SN-38 位置異性体のナノ・プロドラッグの作製と薬効評価

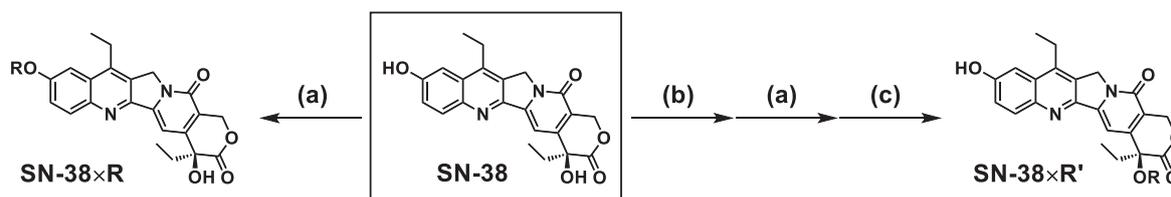
東北大学 多元物質科学研究所

○谷田 恵太, 小関 良卓, 笠井 均

【緒言】近年、ドラッグデリバリーの分野では高分子などから構成されるキャリアに薬物を内包させる手法が報告されているが、キャリア自身による副作用や製造面での問題が指摘されている。我々はキャリアが抱える問題を改善する手法として、キャリアを使用せずに薬物をナノ粒子化した「ナノ・プロドラッグ」を提唱した。これまでに抗がん活性化化合物である SN-38 のフェノール性水酸基に対して様々な置換基を導入したプロドラッグ (SN-38×R) を合成し、再沈法¹⁾に供することでナノ・プロドラッグを作製することに成功している²⁾。そこで本研究では、SN-38 が有するもう一つの水酸基すなわち三級水酸基に着目し、モデルとしてミリスチン酸によるプロドラッグ化を施した SN-38 位置異性体の合成について検討した。発表では、作製したナノ・プロドラッグの物理化学的特性、薬理活性の結果を報告する。また、合成した位置異性体を任意の割合で混合し、再沈法にて共沈を行うことで作製したナノ・プロドラッグについても併せて報告する。

【実験】脱水縮合によりミリスチン酸を導入した SN-38×C₁₄ (yield: 65%, 1 step) を、3 行程の反応により SN-38×C₁₄' (yield: 56%, 3 steps) をそれぞれ合成した (Scheme 1)。得られたプロドラッグの THF 溶液 100 μL を激しく攪拌した水 10 mL 中に注入することで 0.1 mM のナノ・プロドラッグ分散液を作製した。作製したナノ・プロドラッグの粒径・形状を走査型電子顕微鏡で観察し、粒径の経時変化を評価するため動的光散乱法により粒径を測定した。次いで、ナノ・プロドラッグの血中での加水分解性を評価するため、マウス血清中における加水分解耐性を評価した。さらに 0.04–10 μM のナノ・プロドラッグの分散液を、HepG2 細胞 (ヒト肝がん由来) を培養したプレートに添加し、48 時間後の *in vitro* 抗がん細胞活性を WST-8 アッセイにより評価した。

【結果と考察】作製したナノ・プロドラッグを走査型電子顕微鏡により観察したところ、それぞれ粒径が 200 nm 程度の球状粒子であった。マウス血清を用いた加水分解性の評価においては、SN-38×C₁₄ と比較して SN-38×C₁₄' が極めて高い加水分解耐性を示した。さらに、HepG2 細胞を用いて *in vitro* 抗がん細胞活性を評価したところ、加水分解が容易であり活性体を放出しやすい SN-38×C₁₄ が SN-38×C₁₄' と比較して高い薬理活性を示した。また、再沈法で作製する位置異性体の混合ナノ・プロドラッグは混合の割合を変えることで、加水分解性や抗がん細胞活性を任意に変えることができることが明らかになった。



Scheme 1. Synthesis of fatty acid-modified SN-38 regioisomer (R=Myristic acid)
 (a) RCOOH, EDC, DMAP, CH₂Cl₂; (b) (Boc)₂O, Pyridine, CH₂Cl₂; (c) TFA, CH₂Cl₂

1) H. Kasai *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **31**, L1132–L1134 (1992).

2) Y. Koseki *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **89**, 540–545 (2016).

Nano-prodrugs of SN-38 regioisomers: Their Development and physicochemical properties

Keita Tanita, Yoshitaka Koseki, Hitoshi Kasai

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

Tel: +81-22-217-5587, Fax: +81-22-217-5614, E-mail: keita.tanita.p6@dc.tohoku.ac.jp

がん細胞選択的な治療を可能にするペプチド担持型ポリマーの開発

¹九州大学大学院システム生命科学専攻, ²九大未来センター, ³九大分子システムセンター, ⁴九大先端医療イノベーションセンター

○秀野 智大¹, 杉野 竜成¹, 遠山 聖子¹, 松本 蛍¹, 中村 雄太¹, 森 健^{1,2}, 岸村 顕広^{1,2,3}, 片山 佳樹^{1,2,3,4}

【緒言】難治性疾患であるがんの治療法の一つとして、細胞のアポトーシスを誘導する自殺遺伝子を用いる遺伝子治療は以前から存在する。しかし、がん細胞だけでなく、正常細胞でも遺伝子発現が起きてしまい、重篤な副作用を引き起こす問題点が残されており、正常細胞での厳密な遺伝子発現の抑制を実現できるキャリアの開発が望まれている。そこで我々は、種々のがん細胞で異常亢進が認められるプロテインキナーゼ $\text{C}\alpha$ (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。PKC α は基質ペプチドをリン酸化する働きがあるため、PKC α 基質ペプチド担持型ポリマーを用いて、リン酸化に応答して遺伝子発現させることを試みた。しかし、これまで開発したキャリアは、腫瘍内投与では効果を示すものの、血中投与ができないという問題点があった。そこで、本研究では、高い血中安定性を有するポリエチレングリコール (PEG) と、低細胞毒性かつ高い遺伝子発現能を有するポリマーであるトリエチレンテトラミン修飾したポリアスパラギン酸 PAsp(TET) からなるブロックポリマーをベースとし、これに PKC α 応答性を付与することを目的とした。

【実験】定法に従い、TET の導入率が 60mol% の PEG-PAsp(TET) を得た。これに PKC α の基質となるペプチドを修飾した PEG(S) と、ネガティブコントロールとして基質配列の Ser を Ala 置換したものを修飾した PEG(A) を合成した。これらのポリマーとプラスミド DNA (pDNA) で複合体を形成させ、ヒト脳腫瘍細胞株 U-87MG 細胞における遺伝子発現能を評価した。

【結果と考察】¹H-NMR より、PEG(S), PEG(A) のペプチド導入率を 7.2mol%, 6.2mol% と決定した。これらのポリマーは、pDNA (ルシフェラーゼ遺伝子をコード) と約 120 nm の複合体を形成した。また、複合体にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を添加し、24 時間放置しても粒子径が変化しないことから高い塩安定性を確認した。複合体の遺伝子発現実験の結果は、期待したような PEG(A) における遺伝子発現の抑制は見られず、PEG(S) と同程度の遺伝子発現を示した。そこで、私はペプチド修飾率を増加させ、pDNA と基質ペプチドの相互作用をより促進させることを試みた。PEG(S), PEG(A) のペプチド修飾率が 12.4mol%, 10.1mol% であるポリマーを合成し、同様の遺伝子発現実験を行った。その結果、PEG(S) の遺伝子発現量が PEG(A) に比べ、約 9.4 倍高く出ていることを確認することができた (図 1)。今後の方針としては、ペプチド修飾率の最適化を行った後、動物実験を行うことで、本遺伝子キャリアの生体内での治療効果を確認しようと考えている。

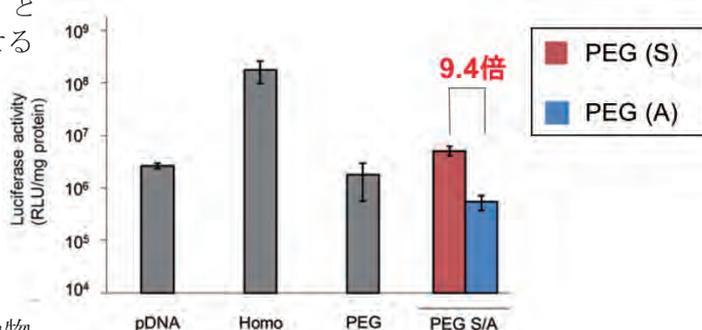


図 1. ペプチド修飾率を増加させたポリマーによる遺伝子発現効率の実験

Development of peptide modified polymer that enables selective treatment of cancer cells

Tomohiro Shuno¹, Ryusei Sugino¹, Shoko Toyama¹, Hotaru Matsumoto¹, Yuta Nakamura¹, Takeshi Mori^{1,2}, Akihiro Kishimura^{1,2,3}, Yoshiki Katayama^{1,2,3,4}

¹ Graduate school of engineering, Kyushu University, ² Center for Future Chemistry, ³ Center for Molecular Systems, ⁴ Center for Advanced Medical Innovation

Tel: +81-92-802-2850, Fax: +81-92-802-2850, E-mail: 3SL17011W@s.kyushu-ac.jp

PMEA 系ランダム共重合体による界面構造制御と生体親和性への影響

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山形大学有機材料システム研究推進本部

○瀬上 裕斗¹, 上田 智也¹, 村上 大樹^{1,2}, 田中 賢^{1,2,3}

【緒言】使用の際に生体成分との接触を伴う材料には異物反応を引き起こさない生体親和性が必須となる。特に血液と接触する人工臓器や人工血管には抗血栓性が求められる。当研究室では材料と生体成分との界面に形成される水和層、特に高分子鎖と中程度に相互作用する「中間水」に着目し、タンパク質吸着や細胞接着の制御において中間水が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた¹⁾。また最近では、含水時に中間水が形成され、血球細胞は接着せずに正常細胞やがん細胞は接着する poly(2-methoxyethyl acrylate)(PMEA)がリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 界面で数十ナノメートルスケールの微細構造を自発的に形成することを報告した²⁾。微細構造の凸部にフィブリノーゲンが選択的に吸着することも確認されており、この微細構造が生体親和性に影響していると考えられる。本研究では、PMEA と化学構造と物性が類似しているが、微細構造およびタンパク質吸着や細胞接着が大きく異なる poly(butyl acrylate) (PBA)に着目し、これらのランダム共重合体の組成により微細構造を制御し、生体親和性への影響を明らかにすることを目的とした。

【実験】2-methoxyethyl acrylate (MEA)と butyl acrylate (BA)を共重合することで MEA の mol%比がそれぞれ 78,47,25 のランダム共重合体 P(MEA-random-BA)(PMBX; X = 78,47,25)を合成した (Fig. 1)。合成した PMBX および PMEA・PBA の 0.2 wt/vol% 溶液を組織培養ポリスチレン上にキャストして作製した高分子膜上でフィブリノーゲンの吸着量と γ 鎖露出度を評価した。また、ポリエチレンテレフタレート上に作製したスピンコート膜を用い、PBS 中での微細構造やフィブリノーゲン吸着挙動の AFM 観察を行った。

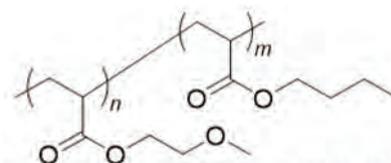


Fig. 1 Chemical structure of PMBX

【結果と考察】各高分子膜上のフィブリノーゲンの吸着量は PMEA では吸着が抑制され、PBA では多量に吸着したことが確認された。PMBX では吸着量は MEA 共重合比の減少に伴い PMEA と PBA の間で単調に増加していたが、フィブリノーゲンの γ 鎖露出度は PMB47 から急激に増加することが確認された。また、AFM 観察結果からは、MEA 共重合比の減少に伴い微細構造の凸部のサイズが次第に大きくなっていることが分かった (Fig. 2)。さらにフィブリノーゲンを吸着させての AFM 観察では、微細構造サイズの増大と共に、PMB47 から凹部でのフィブリノーゲンの吸着が促進されている様子も観察された。微細構造のサイズや組成がフィブリノーゲンの吸着・変性挙動に密接に関係していることが示唆される。発表ではさらに血小板や接着細胞の AFM 観察の結果も合わせて、微細構造と生体親和性との関係について議論する予定である。

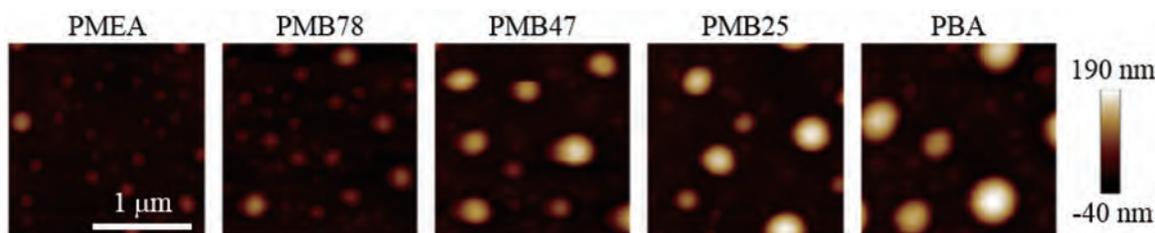


Fig. 2 AFM topographic images of each polymer/PBS interfaces.

【参考文献】

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

Control of Interfacial Structures and Biocompatibility by PMEA Based Random Copolymers

Yuto SEGAMI¹, Tomoya UEDA¹, Daiki MURAKAMI^{1,2} and Masaru TANAKA^{1,2,3}

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

Tel: 092-802-6238, Fax: 092-802-6238, E-mail: masaru_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

Novel Biocompatible Polysaccharide-based Self-healing Slide-ring Hydrogel

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

Ok Sung Cho¹, Tooru Ooya¹

【Introduction】

Hydrogels with remarkable mechanical properties have been investigated by using the slide-ring (SR) gel, which contains topologically interlocked noncovalent cross-links that can slide along a threaded polymer backbone. So far, many slide-ring hydrogels have been successfully investigated. However, most of the slide-ring hydrogels are prepared by using the toxic initiators or the chemical agents, which often causes uncontrollable gelation processes and limited *in vivo* applications. In this study, we report the preparation of slide-ring gels in mild condition without using any toxic chemical reagents, demonstrating soft and good mechanical properties and fast-efficient self-healing behavior using a simple one-pot method.

【Experimental】

Hydroxypropylated aldehyde-polyrotaxane (HP-PRX-ALD, Fig. 1) solution with concentration of 5, 7.5, 10 wt % in distilled water. These were mixed with an aqueous glycol chitosan (GC) solution of 3 wt %. The mixtures were stirred by using vortex for 10 s. The gelation time of the HP-PRX-ALD were observed by the tube inverting method. The mechanical properties of the HP-PRX-ALD/GC

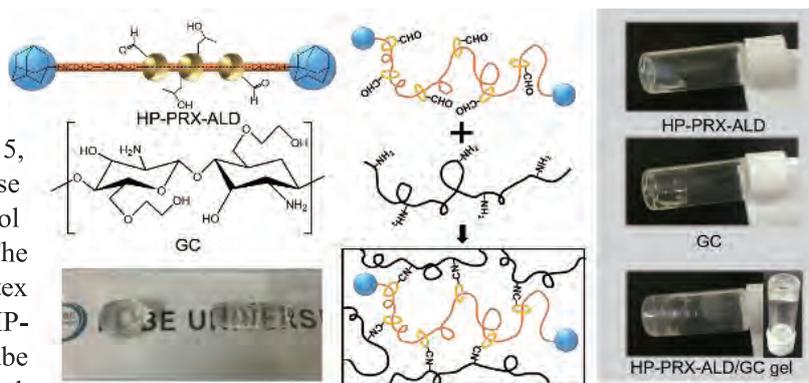


Fig. 1. Schematic illustration of GC/HP/ALD-PRX hydrogels.

gels were studied by a universal material testing machine. Cylindrical HP-PRX-ALD/GC gels were constructed (Fig. 1). All hydrogels were subjected to a constant compression speed of 1 mm min⁻¹. The self-healing properties of the HP-PRX-ALD/GC gels were performed using rheometer.

【Results and Discussions】

The obtained hydrogels are flexible and durable when compressed. Thus, the mechanical properties of these hydrogels are completely different from those of all existing chemical hydrogels. The stress-strain curves displayed that all gels exhibited not only high strength but also over 90 %. The hydrogels did not have a fracture point during the compression process, indicating their non-fragile nature. The hydrogels remained in their original condition without any damage on the surface after 10 loading-unloading cycles. Moreover, the stretching length of hydrogels could reach 630 %, which also displayed fairish elasticity. These results were attributed to the mobile motion of α -CD molecules along the PRX main chain, and the pulley effect might occur. The prepared HP-PRX-ALD/GC hydrogels are not only flexible and durable, but also exhibit self-healing properties at ambient temperature: For example, the original rod-shaped HP-PRX-ALD/GC hydrogel samples were cut into four pieces. Then, the freshly fractured surfaces of the four pieces of the hydrogels were brought into contact, merging to form a single, rod-shaped hydrogel sample. After 30 min, the cut hydrogels became a single hydrogel. The GC/HP/ALD-PRX hydrogels with both outstanding mechanical properties and biocompatibility hold promise for potential use as biomedical materials.

Novel Biocompatible Polysaccharide-based Self-healing Slide-ring Hydrogel

Ok Sung Cho¹, 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.jp

組織工学用ペプチド水ドロゲルの機械的特性の向上

¹ 関西大 化学生命工, ² 大阪医科大学, ³ 関西大 ORDIST

○青山 丈¹, 大槻 周平², 奥野 修大², 根尾 昌志², 柿木 佐知朗^{1,3}, 平野 義明^{1,3}

【緒言】組織工学の分野では、細胞、成長因子そして足場の3つの要素により組織の再生が可能である⁽¹⁾。その3つの要素に含まれる足場には生分解性、細胞接着性、3次元構造体の形成が求められる。足場に求められるこれらの条件を考慮し、ペプチド水ドロゲルを選択した。しかし、ペプチド水ドロゲルは力学的強度の面から限られた場合でしか用いることが出来ない。そこで本研究では、ペプチド水ドロゲルの特性を維持したまま力学的強度を向上させる方法を検討した。

リシン(K)、イソロイシン(I)の繰り返し配列に細胞接着性配列である Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS)を組み込んだ IKIKIKIKIKIRGDSKIKIKIKIKI(KI24RGDS)を本研究で用いた⁽²⁾。KI24RGDSは、親水性表面と疎水性表面を併せ持ち、塩を添加することで疎水性相互作用により自己組織化し、その際、水を内包するため水ドロゲルを形成する。このKI24RGDSの力学的強度の向上のため、塩濃度の検討、 β -ストランド領域の添加による力学的強度の変化について報告する。

【実験】Fmoc 固相合成法で KI24RGDS 合成し、高速液体クロマトグラフィーを用いて精製を行った。また、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)で目的物を同定した。赤外分光法(FT-IR)と円二色性(CD)スペクトル測定により KI24RGDS の二次構造を解析した。イーグル MEM 培地(EMEM 培地)、NaCl 水溶液、リン酸生理食塩水(PBS)の濃度を調整し、KI24RGDS 溶液と混合することで水ドロゲルを形成した。また、KI24RGDS の β -ストランド領域を KI24RGDS 溶液に添加することで水ドロゲルを形成した。レオメーターを用いて作成したペプチド水ドロゲルの力学的強度の向上をレオロジー測定にて評価した。

【結果と考察】MALDI-TOF-MS から目的物由来の分子イオンピークが検出されたため、KI24RGDS の合成できたと判断した。CD スペクトル解析から KI24RGDS は 195 nm~205 nm で負のコットン効果が得られたため、ランダムコイル構造を形成したことが確認された。これはリシン残基間の静電的反発が原因だと考えられる。塩添加系で KI24RGDS を測定するとランダムコイル構造から β -シート構造へ転移することが明らかになった。FT-IR スペクトル解析から、KI24RGDS が β -シート構造をとることを分かった。EMEM 培地と KI24RGDS を混合させたところ、水ドロゲルを形成した。レオロジー測定の結果から 6% KI24RGDS aq. と EMEM 培地から作成したペプチド水ドロゲルは平均貯蔵弾性率 3000 Pa 程度、平均損失弾性率 500 Pa 程度を示した。次に NaCl 水溶液および PBS を用いてゲル化を試みた。各濃度の NaCl 水溶液と 6% KI24RGDS 水溶液を混合させた場合では水ドロゲルを形成した。また、レオロジー測定の結果から NaCl 水溶液の濃度を高めるにつれて、依存的にペプチド水ドロゲルの弾性率が増加することが確認できた。また、PBS の濃度によって作成したペプチド水ドロゲルおよび β -ストランド領域の添加し作成したペプチド水ドロゲルのレオロジー測定の結果について報告する。

【参考文献】

- (1) R Langer, JP Vacanti., *Science*, **260**, 920-926 (1993).
- (2) J. P. Schneider, et. al., *J. AM. CHEM. SOC*, **124**, 15030-15037 (2002).

Improvement of mechanical properties of peptide hydrogel for tissue engineering

Jo AOYAMA¹, Shuhei OTUKI², Shudai OKUNO², Masashi NEO², Sachiro KAKINOKI^{1,3} and Yoshiaki HIRANO^{1,3} ¹ Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering Kansai University, ² Osaka Medical College, ³ Organization for Research and Development of Innovative Science and Technology, Tel: 06-6368-1121, e-mail: yhirano@kansai-u.ac.jp

両親媒性糖鎖ポリマーからなる自己組織化フィルムの構築

京都大学大学院工学研究科

○中村 侑介, 西村 智貴, 澤田 晋一, 佐々木 善浩, 秋吉 一成

【緒言】両親媒性ポリマーは、水中で自己組織化する事で多彩な構造体を形成する。我々はこれまで、Maltopentaose-*b*-poly(propylene oxide)(MPO-PPG, Fig. 1)からなるポリマーが、水中で1層の二分子膜からなるポリマーベシクルを形成する事を見出した。^[1]このベシクルは、リン脂質リポソームや通常のポリマーベシクルとは異なり、低分子物質に対して高い分子透過性を示す事を見いだしている。この機能を利用して、基質を外部から供給しえる酵素反応場として機能する事、さらに、腫瘍周囲でプロドラッグを活性化し、抗がん剤を産生する事で、優れた抗腫瘍効果をもたらす事を明らかにしている。

本研究では、この両親媒性ポリマーの特性に着目し、新規な物質透過性自己組織化フィルムの構築と機能に関する検討を進めている。本発表ではキャスト法による固定化自己組織化フィルムの作製、その内部構造の構造解析やフィルムの水溶液中での安定性などの物性評価について報告する。

【実験】MPO-PPGの粉末をメタノールに溶解させ、Divinyl Sulfone(DVS)を架橋剤として添加した。この溶液をシリコンシート上にキャストし、約五日間風乾させることでフィルムを作製した。このフィルムの内部構造をSPring-8 BL40B2において放射光X線小角散乱測定(SAXS)により調べた。また、作製したフィルムを一晩PBS中に浸漬させることにより耐水性を調べた。

【結果と考察】上記の手法により透明かつ、フリースタンディングなフィルムが得られた。Fig.2に得られたフィルムの放射光X線小角散乱測定の結果を示す。図中の黒い点は六方晶構造を示しており、赤い点はラメラ構造を示している。7枚のフィルムで測定した結果、すべてのフィルムで同様の結果を示したため、MPO-PPGフィルムは六方晶とラメラのハイブリッド構造をとることが明らかとなった。

次に、フィルムをPBS中に浸漬した所、浸漬する前ではフィルムは透明であった。浸漬後では白濁していたものの、フィルムの形状は保っていたため一定の耐水性があることが確認された。

さらに、水和したフィルムを氷水で冷却すると、小さな断片へと崩壊した。これはPPGが疎水性から親水性に変化し、疎水化相互作用が失われてフィルムの形状を保てなくなったためであると考えられ、温度応答性の効果が確認された。

【参考文献】1. T. Nishimura, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Adv. Mater.*, 2017, 29, 36, 1702406

Preparation of self-assembled film composed of amphiphilic carbohydrate polymers

Yusuke NAKAMURA, Tomoki NISHIMURA, Shin-ichi SAWADA, Yoshihiro SASAKI, and Kazunari AKIYOSHI

Graduate School of Engineering, Kyoto University

Tel: +81-75-383-2589, Fax: +81-75-383-2590, E-mail: nakamura.yusuke.82w@st.kyoto-u.ac.jp

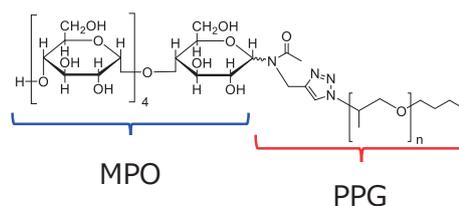


Fig.1 Chemical structure of MPO-PPG

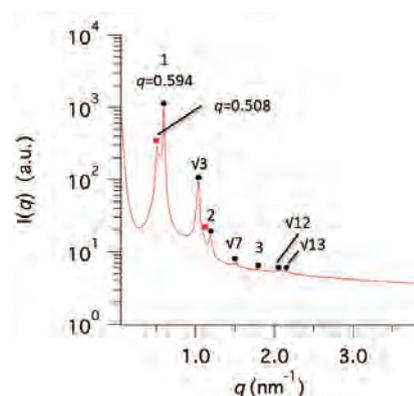


Fig.2 The SAXS profile of MPO-PPG film

蛍光標識法を利用した放射線架橋タンパク質ゲルの架橋構造解明

¹群馬大学大学院, ²量子科学技術研究開発機構

○吉田 郁也¹, 木村 敦², 田口 光正²

【緒言】

コラーゲンやゼラチン、ペプチドなどのタンパク質は、生体適合性や生分解性の高い有用材料として医学、薬学、および生物学分野に応用されている。放射線改質・加工法は、照射によって生成したラジカルを起点とした架橋反応により、橋かけ助剤等の化学薬品を必要とすることなくタンパク質の改質、ゲル化が可能となる優れた手法である。そのため、近年では、再生医療や診断に応用可能な培養環境でも溶けない架橋ハイドロゲルの開発に利用されている。本研究では、代表的なタンパク質であるゼラチンの分子レベルでの放射線架橋構造を明らかにし、放射線架橋ゲルの優れた物性（耐熱性や保水性、ゲルの形状保持性、細胞接着性等）の発現因子を明らかにすることを目的とした。

【実験】

濃度 10 wt.% のゼラチン水溶液に、室温において γ 線を 60–160 kGy (Gy=J/kg) 照射することで、放射線架橋ゲルを作製した。未照射および放射線架橋ゲルを 110 °C、24 h で塩酸と反応させ、加水分解し、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole と反応させ蛍光標識し、HPLC により分析した。ゲル中に含まれる各種アミノ酸残基について、標準試薬との比較から定性・定量を行った。また、Phe 水溶液への放射線照射により Phe 二量体を作製し、放射線架橋ゲルの架橋アミノ酸残基の分離・定性を行った。

【結果と考察】

未照射ゼラチンと放射線架橋ゲルに含まれるアミノ酸残基組成を比較した結果、照射によりゼラチン中の各種アミノ酸残基が減少するものの、特に Phe の減少率が大きく、160 kGy において約 27% となった (図 1)。これにより、Phe が放射線架橋の原因物質の一つと推測された。また、Phe 水溶液への放射線照射で得られた Phe 二量体のピークが、放射線架橋ゲルの加水分解のクロマトピークと一致した。さらに、放射線照射で生じる水酸化ラジカルは、Phe などの芳香環に対し大きな反応速度定数を有することから、Phe 残基が放射線架橋ゲルの架橋部位の一つであることが強く示唆された。

以上の結果から、放射線架橋では、Arg-Gly-Asp-配列が損傷されにくいため細胞接着性が保持された足場材料や、Lys のアミノ基や Asp、Glu のカルボキシル基などが消費されにくいことを利用した DDS 薬剤や MRI マーカーを結合させた造影剤などの創出が可能と考えられる。

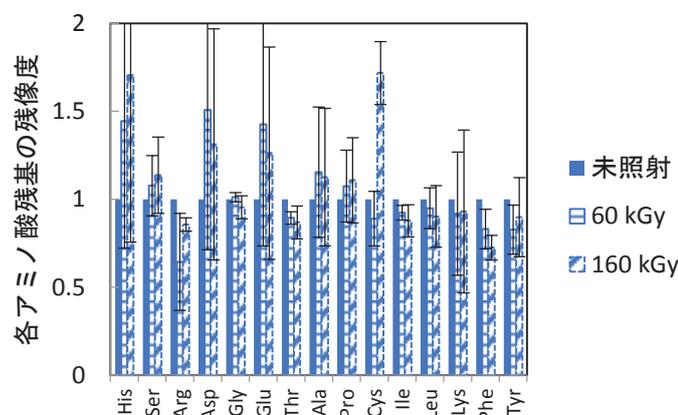


図 1 各アミノ酸残基の線量に対する残存度

Structural analysis of radiation crosslinked gelatin using fluorescent labeling method

Fumiya YOSHIDA¹, Atsushi KIMURA², Mitsumasa TAGUCHI²

¹ Graduate School of Science and Technology Gunma University,

² National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Tel: 0273469386, Fax:0273469422, E-mail: taguchi.mitsumasa@qst.go.jp

足場材料のマイクロ化による新規なボトムアップ組織構築法の創製

¹大阪大学大学院 工学研究科, ²JST-さきがけ
○中 康博¹, 西 宏基¹, 松崎 典弥^{1,2}

【緒言】組織工学分野において、三次元組織体の構築が求められている。三次元組織体の構築では、細胞の接着、増殖、細胞外マトリックス (ECM) 産生を促進し、細胞の分化を制御する役割をもつ足場材料の構築が重要である。これまで、足場材料として生分解性の多孔質材料が用いられてきたが、材料内部まで細胞を均一に導入することは、高い気孔率を有する連通孔を持ってしても困難であった。また、ゲルも足場材料として用いられているが、90%以上が水であるため、生体類似の高い ECM 濃度を再現することは難しかった。当研究室では、最近、コラーゲンをマイクロファイバー化した、数百 μm サイズの足場材料を用いることで、生体類似の高濃度コラーゲンを再現可能な新しい組織構築法を報告してきた。本研究では、熱架橋と超音波処理によりおよそ 10 μm のファイバーを作製し、ファイバーの長さの違いが組織構築に影響することを見出したので報告する。

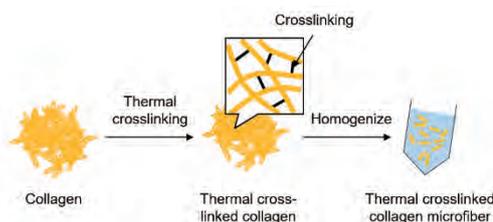


Figure 1. Schematic illustration of preparation of thermally crosslinked collagen microfibrils.

【実験】ブタ皮膚由来 I 型コラーゲン (日本ハム (株) より提供) を 200 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間真空乾燥することで熱架橋コラーゲンを得た。熱架橋後の重量を測定することで収率を計算した結果、93%であった。50 mg の熱架橋コラーゲンを 5 mL の超純水中で 6 分間細断することで、熱架橋 CMF (cCMF) を得た。さらに cCMF を超純水中で超音波処理することで、超音波処理 CMF (sCMF) を得た。

【結果と考察】コラーゲンは、熱架橋前後で色や形状に大きな変化はなく、熱変成は起こっていないと考えられる。架橋温度と架橋時間を変えて作製した熱架橋コラーゲンのアミノ基の架橋度を、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を用いて吸光度測定により算出した。架橋温度が 150 $^{\circ}\text{C}$ の場合、24 時間インキュベート後の架橋度はわずか 4%であったが、200 $^{\circ}\text{C}$ にすることで架橋度は 12%に大きく増加した。また、架橋時間を 24 時間から 48 時間に増加させると、架橋度は 12%から 16%まで増加した。TNBS と一級アミンが求核置換反応により結合するため、コラーゲン中のリシンやヒドロキシリシンと反応したと考えられる。超純水中で熱架橋コラーゲンを 6 分間細断することで、長さ約 300 μm の cCMF が得られた。また cCMF をさらに超音波処理することで、長さが約 15 μm と cCMF の 20 分の 1 程度になった sCMF が得られた。熱架橋コラーゲンをを用いて作製した cCMF と sCMF 分散液の時間経過における透過率の変化を測定した。どちらの CMF も、始めは溶液に均一に分散し、透過率が 10%以下であった。しかし、cCMF は時間に伴い速やかに沈降し、20 分後には透過率 70%以上と高い値を示した。一方、sCMF は 20 分後にも透過率 20%以下と分散状態を維持していた。本手法は、高い水分散安定性を有するコラーゲンファイバーとして応用が期待される。

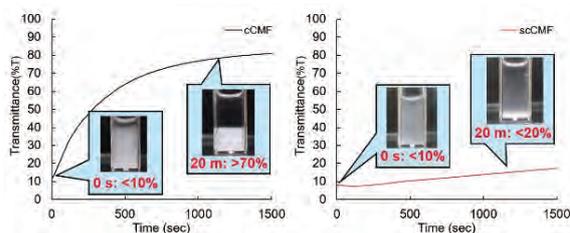


Figure 2. Transmittance of cCMF (left) or sCMF (right) dispersion depending on time.

New bottom up-style organization using the microscaffolding

Yasuhiro Naka¹, Koki Nishi¹, Michiya Matsusaki^{1,2}

¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University

² JST-PRESTO

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

異なる脱細胞化方法で調製した ECM ヒドロゲルの特性評価

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ²大阪工業大学 工学部 生命工学科
 ○門田 純平¹, 橋本 良秀¹, 藤里 俊哉², 木村 剛¹, 岸田 晶夫¹

【緒言】 生体組織から細胞成分を除去した脱細胞化生体組織は、細胞外マトリクス (ECM) として代替移植材料への応用が検討されている。最近、脱細胞化生体組織を酵素などで可溶化し再構成した ECM ヒドロゲルが、生体組織の生理活性物質を有しており、抽出コラーゲンなどの単成分ヒドロゲルとは異なる特性を発現する材料として研究されている。脱細胞化処理方法は、界面活性剤による化学的手法が一般的であるが、他にも凍結融解法などの物理的手法も報告されている。我々は、組織損傷が少ない処理方法として高静水圧処理 (HHP) 法を検討しており、この手法により作製した ECM ヒドロゲルは、化学的手法に比べて組織構造と生理活性物質が保持されており、組織の再構築に有用ではないかと考えている。本研究では、ブタの膀胱組織 (Urinary bladder matrix: UBM) と小腸粘膜下組織 (Small intestinal submucosa: SIS) を異なる方法で脱細胞化し、それらの ECM ヒドロゲルの特性を評価した。

【実験】 ブタ膀胱および小腸を、(1) TritonX-100 とデオキシコール酸による界面活性剤法、(2) HHP 法 (600 MPa)、(3) HHP 法 (980 MPa) により脱細胞化 UBM 組織および SIS 組織を調製した。脱細胞化は、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と DNA 残存量によって評価した。脱細胞化生体組織の組成評価のために、ヒドロキシプロリン量および硫酸化グリコサミノグリカン (sGAG) 量を評価した。得られた脱細胞化生体組織は、凍結乾燥して電動ミルで粉末化した。組織粉末に pepsin-HCl 溶液 (pH 2.0, 1 mg/mL) を添加して可溶化した (室温、48 時間)。可溶化後、pH と塩濃度を生理的条件に調整し、37°C で 1 時間インキュベートして ECM ヒドロゲルを作製した。ゲル作製時の濁度変化を測定することで、ゲル化挙動を評価した。作製した ECM ヒドロゲルは、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察ならびに圧縮試験によりヒドロゲル構造および機械的特性を評価した。

【結果と考察】 DNA 残存量の測定結果より、各処理方法による有意な脱細胞化 (DNA 残存量 < 50 ng/mg dry weight) が確認できた。また、HE 染色の観察結果および成分評価より、界面活性剤処理と比較して HHP 処理における組織構造や組成への影響が少ないことが確認された。ECM ヒドロゲルの比濁度測定によるゲル化挙動を評価した結果、HHP 処理組織由来 ECM ヒドロゲルにおいて、早期のゲル形成が観察された。また、SEM 観察および圧縮試験によるゲル構造と機械的特性を評価した結果、UBM、SIS 両組織において界面活性剤法で調製した試料よりも HHP 法で調製した試料の方が高い弾性率と破断強度を示した。以上の結果より、ECM ヒドロゲルは脱細胞化処理方法によって異なる特性を示すことが明らかとなった。

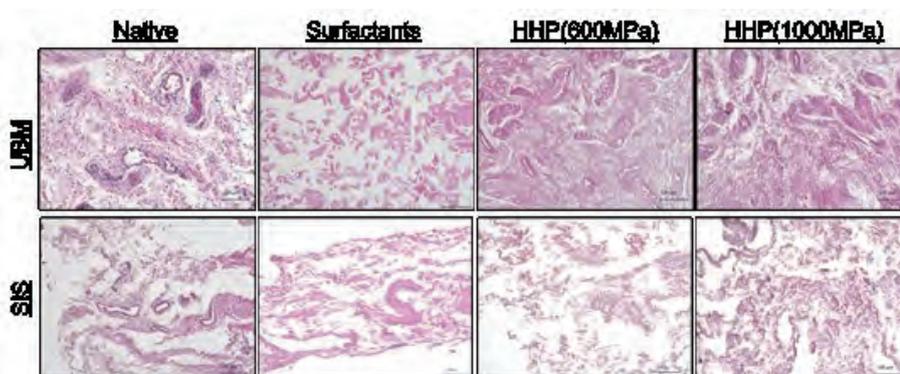


Fig. 1. H-E staining images of decellularized UBM and SIS with various decellularized methods.

Characterization of ECM hydrogels prepared by different decellularization methods

Junpei Kadota¹, Yoshihide Hashimoto¹, Toshiya Fujisato², Tsuyoshi Kimura¹, Akio Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology

Tel: +81-3-5280-8110, FAX: +81-3-5280-8005, E-mail: ma170033@tmd.ac.jp

細胞を高分子で化学架橋したゲルの開発および細胞種がゲルの物性や機能に及ぼす影響

甲南大学フロンティアサイエンス学部

○青山 星海, 長濱 宏治

【緒言】近年、私たちは細胞を活用した新しい機能性材料として、生細胞を高分子で化学架橋したゲル(細胞架橋ゲル)を作製した(Figure 1)。細胞架橋ゲルでは、細胞にゲルの物理化学的性質を付与し、一方でゲルに細胞の性質や応答を付与できるため、従来の機能性材料が発現できないユニークな機能を示すと考えられ、再生医療やDDSなどに有用な新規バイオマテリアルになると期待できる。

細胞架橋ゲルでは、細胞種や高分子種を変化させることで、ゲルが示す機能のバラエティーを拡張できる。細胞架橋ゲルでは、細胞が高分子の三次元ネットワークと共有結合により繋がれ、束縛されている。一方で、生体内で細胞は、細胞外基質が構築する三次元ネットワークと物理的に結合している。つまり、細胞架橋ゲルの細胞は、生体では決して起こりえない特殊な状況に置かれている。本研究で私たちは、細胞架橋ゲルの特徴をより詳細に理解することを目的に、①細胞種の変化により細胞架橋ゲルの物性や機能は制御可能か、②ゲル内の特殊な三次元状態が細胞応答にどのように影響するのか、について調べた。

【実験】ヒト神経芽腫細胞(SH-SY5Y)の培地にアジド化マンノサミンを加えて3日間培養し、膜タンパク質の糖鎖シアル酸へアジド基を導入した。アジド化細胞とアルキン化ローダミンを反応させ、共焦点顕微鏡観察によりアジド化効率およびアジド基の反応性を調べた。共焦点顕微鏡観察や生化学的なアッセイにより、アジド化細胞と非アジド化細胞の増殖率、接着面積、分化効率を比較した。アジド化細胞とアルキン化分岐型アルギン酸をクリック架橋反応させ、神経芽細胞架橋ゲルを作製した。ほかの細胞種を用いて同様にゲルを作製し、レオメータ測定によりゲルの力学物性を比較した。

【結果と考察】アジド化処置を行った神経芽細胞とアルキン化ローダミンを反応させると、細胞膜に沿ってローダミン由来の蛍光が見られたことから、細胞表面糖鎖シアル酸へアジド基導入が可能であり、そのアジド基はクリック反応可能であることがわかった。アジド基を導入した細胞は、非アジド化細胞よりも増殖性が低下し、接着面積は増大し、分化効率が向上することがわかった。これらの結果より、アジド基導入により細胞の接着機構が変化し、これによりシグナル伝達に変化し、増殖性が抑えられ、分化にシグナルがシフトしやすくなったのではないかと考えられる。細胞架橋ゲルで、細胞の化学架橋はゲルの力学特性に反映されることがわかった。神経芽細胞架橋ゲルと比べ、筋芽細胞架橋ゲルは著しく高い力学強度を示したことから、固有の力学特性が異なる細胞種を使い分けることで、ゲルの力学特性を変化させることができると示唆される。

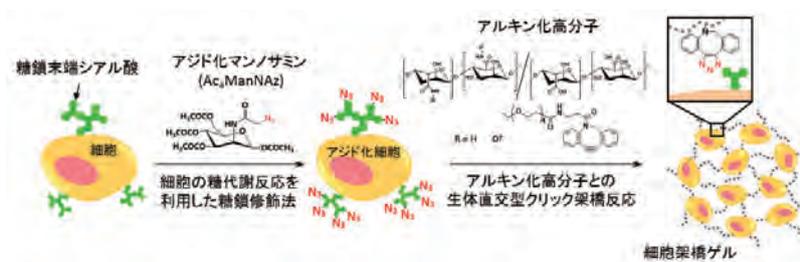


Figure 1. 細胞架橋ゲルの作製方法

Functional hydrogels generated by click cross-linking reaction between azide-modified cells with alkyne-modified polymers and effect of cell types on its physicochemical properties and functions

Seika AOYAMA and Koji NAGAHAMA

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

Tel: +81-78-303-1328, Fax: +81-78-303-1495, E-mail: nagahama@center.konan-u.ac.jp

ハイブリッドスフェロイド培養法を用いたリン酸カルシウム系材料の骨再生能の評価

東北大学大学院歯学研究科¹顎口腔機能創建学分野,²口腔システム補綴学分野,³歯学イノベーションリサーチセンター,⁴九州大学 先端物質化学研究所

○佐藤 智哉^{1,2}, 穴田 貴久^{1,4}, 塩飽 由香利^{1,3}, 濱井 瞭¹, 土屋 香織¹, 佐々木 啓一², 鈴木 治¹

【緒言】近年、再生医療の開発現場において、間葉系幹細胞（MSC）や iPS 細胞を用いた三次元の細胞組織体を生体外で作製することが盛んに行われている。三次元の細胞組織体の一つであるスフェロイド（球状細胞凝集塊）は細胞密度が高く、細胞同士が三次元的に接着するため、通常行われる平面培養に比べてより生体内に近い状態での培養が可能である。そのためスフェロイド培養は動物実験の代替法として、新薬開発のための薬剤スクリーニング法にも利用されている。

一方、骨再生医療におけるリン酸カルシウム系人工骨補填材の開発には *in vitro* での試験に加え、実験動物を用いた骨再生能の評価が未だ欠かせない。しかしスフェロイド培養は、リン酸カルシウム系人工骨補填材の骨再生能に関しても、動物実験に代わる迅速かつ簡便な評価系となりうる。既に我々は、MSC とリン酸カルシウム系材料のハイブリッドスフェロイドを構築する技術を開発し、ハイブリッド化する材料の種類によって MSC の骨芽細胞分化の程度が異なることを明らかにしている¹。そこで本研究では、リン酸カルシウム系人工骨補填材の骨再生能について動物実験に代わる評価系を開発することを目的に、*in vivo* におけるリン酸カルシウム系材料の骨再生能と、MSC のハイブリッドスフェロイド培養における骨芽細胞分化の関連性について検討した。

【実験】*in vivo* 試験として、顆粒径を揃えたリン酸カルシウム系材料を、マウス頭蓋冠規格化骨欠損部に埋入し、10 週間飼育後に骨を回収して新生骨の評価を行った。リン酸カルシウム系材料には、既存の人工骨補填材であるハイドロキシアパタイト（HA）、β リン酸三カルシウム（β-TCP）と、当分野で開発した骨再生材料の一つであるリン酸オクタカルシウム（OCP）を用いた。OCP は HA の前駆体と考えられており、間質細胞の骨芽細胞分化を促進することを報告している^{2,3}。

in vitro 試験として、マウス間葉系幹細胞株 D1 細胞とリン酸カルシウム系材料のハイブリッドスフェロイドを製作し、7 日間骨分化培養を行った。スフェロイド培養には、我々が開発した酸素透過性スフェロイド培養器（Oxy chip）を用いた⁴。アルカリフォスファターゼ（ALP）活性とリアルタイム PCR 法による骨分化マーカーの測定を行い、*in vivo* 試験の結果と比較した。

【結果と考察】マウス頭蓋冠規格化骨欠損部での新生骨は、OCP 埋入群で最も多く形成された。ハイブリッドスフェロイド培養では、OCP との複合体で、ALP 活性が最も上昇し、骨芽細胞関連遺伝子の一つであるオステオポンチンの発現量も最も多かった。さらに、これらの新生骨量と、ALP 活性、オステオポンチンの発現量には、使用したリン酸カルシウム系材料ごとに特有の関連性がみられた。以上の結果から、MSC とリン酸カルシウム系材料で構成されるハイブリッドスフェロイドの骨分化培養を行い、その骨芽細胞分化について解析することにより、*in vivo* でのリン酸カルシウム系材料の骨再生能を *in vitro* で迅速かつ簡便に評価できる可能性が示唆された。

【参考文献】

1) Anada T, Sato T, Kamoya T et al., Regenerative Therapy, 2016; 3: 58-62, 2) Suzuki O, Japan Dental Science Review, 2013; 49: 58-71, 3) Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T et al., Biomaterials, 2006; 27: 2671-2681, 4) Anada T, Fukuda J, Sai Y et al., Biomaterials, 2012; 33: 8430-8441

Comparative study on osteoconductive property of calcium phosphate materials by a 3D cell culture system

Tomoya Sato^{1,2}, Takahisa Anada^{1,4}, Yukari Shiwaku^{1,3}, Ryo Hamai¹, Kaori Tsuchiya¹, Keiichi Sasaki², Osamu Suzuki¹

¹Division of Craniofacial Function Engineering, ²Division of Advanced Prosthetic Dentistry, ³Liaison Center of Innovative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan, ⁴Institute for Materials Chemistry and Engineering, Fukuoka, Japan

Tel: +81-22-717-7635, E-mail: tomoya.sato.p7@dc.tohoku.ac.jp; suzuki-o@m.tohoku.ac.jp

ラット先天性顎裂モデルにおける多能性前駆細胞を播種した EGCG 結合ゼラチンの骨形成

¹大阪歯科大学口腔インプラント学講座, ²京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル学専攻,

³大阪歯科大学中央歯学研究所

○笹山 智史¹, 原 朋也¹, 田中 知成², 本田 義知³, 馬場 俊輔¹

【緒言】唇顎口蓋裂や広域骨欠損部位での骨再生は未だ困難である。演者らは、緑茶由来エピガロカテキンガレート(EGCG)に注目し、EGCG をゼラチンに化学結合させた EGCG 結合ゼラチンスポンジ(EGCG-GS)を開発し、その骨再生研究を日々進めている。さらに、EGCG-GS に真空加熱を施した真空加熱型カテキンゼラチン(vhEGCG-GS)が、EGCG-GS や真空加熱型ゼラチン(vhGS)に比べ優れた骨再生能を示すことを明らかにした。しかし、骨再生用細胞播種材料としての有用性は明らかになっていない。本研究では、新規細胞播種担体の開発に向け、vhEGCG-GS の材料学的評価を行った。また、ラット先天性顎裂モデルに多能性前駆細胞である脱分化脂肪細胞(DFAT)と脂肪由来幹細胞(ADSC)を播種した vhEGCG-GS と vhGS を埋入し、骨形成能・機序を比較検討した。

【実験】vhEGCG-GS は、EGCG を豚皮膚由来タイプ A ゼラチンに化学結合させ、凍結乾燥、真空加熱処理(150°C、24 時間)を施して作製した。対照実験として、同様の方法を応用し EGCG を含有しない vhGS を作製した。得られた両担体の材料学的評価に、走査型電子顕微鏡(SEM)観察、Zeta 電位測定、接触角測定を行った。両細胞は、F344 ラット雄 8 週齢の鼠径部より採取した脂肪組織から調整した。骨形成能は、同ラット雄 8 週齢 70 匹の顎裂欠損部(直径 2mm、高さ 4mm)に各試料を埋入し、4、8 週後マイクロ CT による骨形態計測と組織学的評価を行った。実験群として両担体へ DFAT あるいは ADSC を播種した群、対照群として非埋入群、vhGS、vhEGCG-GS 単独群の計 7 群(n=5)を用いた。さらに、*in vitro* にて細胞接着性を dsDNA アッセイと蛍光免疫染色、リン酸カルシウムの析出をフーリエ変換赤外分光分析と X 線光電子分光法を用いて評価した。統計解析には、一次元分散分析と Tukey-Kramer 法を用いた。

【結果と考察】SEM 観察、dsDNA アッセイ、蛍光免疫染色より vhEGCG-GS は vhGS に比べ細胞接着能に優れ、より多くの細胞を効率的に捕捉した。骨形態計測と組織学的評価より、両細胞とも vhEGCG-GS へ播種した群で優れた骨形成を認めた。また、Zeta 電位測定では、vhGS はプラスに帯電、vhEGCG-GS はマイナスに帯電していた。文献的考察によると EGCG は多様な薬理効果を持つが、本結果を考慮すると、EGCG の結合はゼラチン担体の表面性状を変化させ、効率的な多能性前駆細胞の捕捉、骨形成を増強させる新たな表面修飾方法となる可能性が示唆された。以上より、vhEGCG-GS は唇顎口蓋裂、広域骨欠損や外傷部位などの骨形成を促進させ、審美的な回復に貢献する新規細胞播種担体となりえる可能性が示唆された。

Osteogenesis of multipotent progenitor cells with the epigallocatechin gallate modified-gelatin sponge in rat congenital cleft jaw model

Satoshi SASAYAMA¹, Tomoya HARA¹, Tomonari TANAKA², Yoshitomo HONDA³, Shunsuke BABA¹

¹Department of Oral Implantology, Osaka Dental University. ²Department of Biobased Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology. ³Institute of Dental Research, Osaka Dental University. Department of Oral Implantology, Osaka Dental University. 8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata, Osaka 573-1121, Japan. Tel: +81-72-864-3073, Fax: +81-72-864-3173, E-mail: sasayama@cc.osaka-dent.ac.jp

光刺激で LCST が変化するスピロピラン導入 PNIPAm ブラシ表面の創製と細胞挙動制御

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
○渡邊里奈, 長田和歩, 今任景一, 武田直也

【緒言】外部刺激により細胞接脱着を制御できる基材は、再生医療や組織工学への応用が期待されている。その中でも、生体環境下で 30 °C 付近に下限臨界溶液温度 (LCST) を示し、その前後でぬれ性を大きく変化させる poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAm) ポリマーブラシを修飾した表面は、温度変化で細胞接脱着を制御でき、シート状細胞組織の回収も可能とした最も成功した基材と言える。この接脱着制御が局所的・即時的・低侵襲に刺激できる光で可能になれば、単一細胞操作や複雑な組織の作製など、さらなる発展が期待できる。そこで本研究では、光異性化で大きな極性変化を示すスピロピラン (SP) を PNIPAm 鎖中に導入することで、LCST を光制御可能な光応答性 PNIPAm を開発し、これを修飾したポリマーブラシ表面を作製した (Fig. 1)。また、PNIPAm は LCST 前後で coil—globule 転移による構造変化を起こす。そこで、細胞非接着性の poly(ethylene glycol) (PEG) も共にガラス基板表面に grafting to 法で修飾し、光応答性 PNIPAm の構造変化で PEG の表面露出度合いを変化させ、細胞接着性の光制御を試みた。

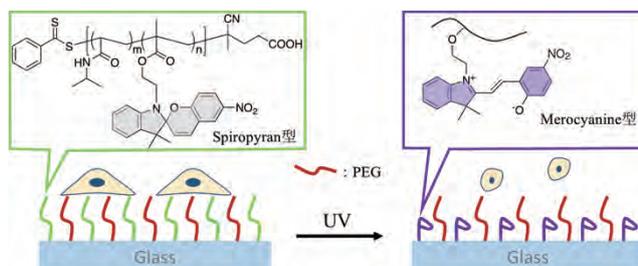


Fig. 1. Photoresponsive PNIPAm/PEG brush surface.

【実験】NIPAm および SP を導入した methacrylate 誘導体—SPMA—を 66.3:1.3 (observed) の比率で共重合して poly(NIPAm-co-SPMA) を作製し、UV-Vis 分光光度計にて LCST 測定を行った。このポリマーと PEG をシランカップリング剤で導入した(3-glycidyloxypropyl)基を介してガラス基板に修飾し、混合ポリマーブラシ修飾表面を作製した。この際、PEG の量を変化させて細胞接着性の制御を試みた。基板は XPS と FT-IR で表面組成とグラフト密度の解析を行った。次いで、混合ポリマーブラシ修飾基板上にウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) を播種し、UV 光照射の有無による細胞接着性の差異を評価した。

【結果と考察】合成した光応答性 PNIPAm は、水中において LCST が 42 °C であり、通常の細胞培養温度 37 °C では水溶性となった。ここに UV 光を照射して SP を極性の高いメロシヤニン (MC) へ光異性化すると、予想に反して LCST が 25 °C へと低下した。これは、高極性の水中では UV 光未照射時にすでに SP の一部が MC となり、ポリマー鎖の水溶性を増加させた一方、UV 光照射で多くの MC が生じたことで MC 同士の凝集が起こったためと考えられる¹⁾。この光応答性 PNIPAm と PEG の混合ポリマーブラシ修飾基板上に BAEC を播種すると、特に両者の比率が 5:1 の表面では、UV 光未照射時に BAEC は良好に接着・増殖した一方、UV 光照射表面に対しては接着・増殖しにくいことが見出された (Fig. 2)。これは、光応答性 PNIPAm の LCST が 25 °C へと低下することで、37 °C の培養温度では globule 構造となり PEG 鎖が露出したためと考えられる (Fig. 1)。以上のように、本研究では細胞接着性の制御が可能な光応答性 PNIPAm ブラシ表面の開発を達成した。

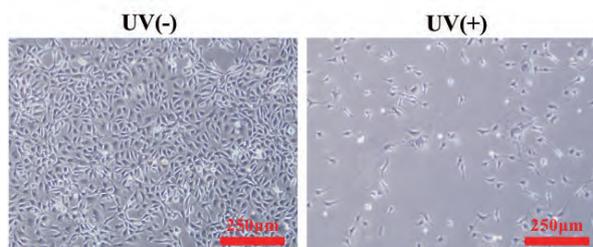


Fig. 2. Cell adhesion control by UV light irradiation.

1) E. Goldburt, et al, *Macromolecules* **1984**, 17:1225—1230.

Spiropyran introduced PNIPAm brush surface for photocontrol of LCST and cell adhesion behaviors
Rina WATANABE, Kazuho NAGATA, Keiichi IMATO, Naoya TAKEDA

Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University (TWIns)

Tel: +81-3-5369-7323, Fax: +81-3-5369-7323, E-mail: ntakeda@waseda.jp

Influence of viscosity property of gelatin solution on chondrocyte functions

¹Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki

²Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki

○Kyubae Lee^{1,2}, Naoki Kawazoe¹ and Guoping Chen^{1,2}

【Introduction】 Many studies have been conducted on how mechanical cues affect cell behavior by controlling matrix stiffness. These studies have revealed that matrix stiffness is one of the key parameters affecting cell function such as cell morphology, migration, proliferation, and differentiation. Such approaches have mainly focused on how matrix stiffness affects cell functions. In contrast to matrix elasticity, it is not clear how viscosity of fluids surrounding cells affects cell functions. In this study, aqueous solutions of gelatin with different viscosity were prepared and used for 3D culture of bovine articular chondrocytes (BACs) to investigate the effect of viscosity of gelatin aqueous solution on chondrocyte functions.

【Materials and Methods】 Gelatin aqueous solutions with different concentration and viscosity were introduced in covalently crosslinked gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogel to construct a biphasic hydrogel, which had gelatin solution inner phase encapsulated with GelMA hydrogel outer phase. At first, BACs were mixed with gelatin solution having a concentration of 5, 10 or 15 % (w/w). Subsequently, the mixture suspension solution was casted in a silicone frame and cooled down to form a hydrogel sheet. The gelatin hydrogel gel sheet laden with chondrocytes was cut into microcubes with a nylon mesh. Finally, the cell-laden gel microcubes were mixed with GelMA macromers and crosslinked to generate GelMA hydrogels by UV-initiated crosslinking reaction. The chondrocyte-laden biphasic hydrogels were cultured at 37 °C and the gel microcubes became solution. The cell/hydrogel constructs were cultured up to 21 days. DNA amount in each hydrogel was quantified to evaluate cell proliferation. Cytoskeleton of BACs was stained with fluorescence-labeled phalloidin and observed with a confocal laser fluorescence microscope.

【Results and Discussion】 The gelatin solutions with different viscosity showed different effect on the proliferation and cytoskeletal structure formation of BACs. Proliferation of BACs was enhanced in gelatin solution with a low viscosity, whereas suppressed in gelatin solution with a high viscosity. Observation by confocal laser fluorescence microscopy showed that BACs cultured in low-viscosity solution formed cube-shaped cytoskeletal structures faster than those in high-viscosity solution. Interestingly, BACs were constrained in the microcubes without migration to the bulk hydrogel regions. The results indicated that viscosity of microenvironment surrounding cells could affect cell functions.

Influence of viscosity property of gelatin solution on chondrocyte functions

Kyubae Lee^{1,2}, Naoki Kawazoe¹, Guoping Chen^{1,2}

¹Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science ²Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba
Tel: +81-29-8604496, Fax: +81-29-8604673, E-mail: Guoping.CHEN@nims.go.jp

Influence of cell morphology on gene transfection into mesenchymal stem cells

¹物質材料研究機構 機能性材料研究拠点, ²筑波大学 数理物質科学研究科
○楊 英俊^{1,2}, 王 新竜¹, 川添 直輝¹, 陳 国平^{1,2}

【Introduction】 Gene transfection, which is a technique for delivering exogenous genes into eukaryotic cells, is widely applied in researches on cell functions. In particular, gene transfection into primary cells such as mesenchymal stem cells (MSCs) remains still challenge because they are one of the typical difficult-to-transfect types of cells. Although various gene carriers have been developed, little attention has been paid to the effect of cell morphology on gene transfection efficiency. In the present study, we compared gene transfection efficiency for MSCs with different cell spreading and elongation to clarify the relationship between cell morphology and transfection efficiency. To do this, we prepared micropatterned surfaces with different cell spreading areas and aspect ratios by photolithography, cultured MSCs on the micropatterned surface, and transfected green fluorescent protein (GFP) genes into the micropatterned cells.

【Materials and Methods】 Photoreactive poly(vinyl alcohol) (PVA) was micropatterned on a cell culture polystyrene plate surface by photolithography. The micropatterned surface had cell adhesive circles with different diameters of 20, 40, 60 and 80 μm to control cell spreading, and ellipses with different aspect ratios of 1, 2, 4 and 8 to control cell elongation. Then human MSCs were seeded on the micropatterned surface and cultured for 1 day. After culture, GFP expressing plasmid vectors (pAcGFP) were transfected into the micropatterned MSCs with LipofectamineTM 2000. The gene transfection efficiency was evaluated by observing the green fluorescence of the cells. To further explore the mechanism underlying gene transfection on micropatterned surface, the cellular uptake capacity of cationic complexes was evaluated through cellular uptake amount of cationically modified FITC-labelled microspheres as a model. Additionally, the level of plasmid replication was analyzed through BrdU staining.

【Results and Discussion】 The fluorescence images indicate that transfection efficiency increased with the increasing of spreading area and aspect ratio (Fig.1). To further explore the influence of cell morphology on the exogenous gene endocytosis and DNA replication in the gene transfection, the cellular uptake capacity and nuclear activity were also investigated. The results showed that the promoting effect of gene transfection by cell spreading area and aspect ratio might be attributed to the enhanced uptake of the cationic gene complexes and replication of exogenous genes. In conclusion, exogenous gene transfection into MSC was affected by cell spreading and cell elongation.

Influence of cell morphology on gene transfection into mesenchymal stem cells

Yingjun Yang^{1,2}, Xinlong Wang¹, Naoki Kawazoe¹, Guoping Chen^{1,2}

¹Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science

²Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba

Tel: 81-29-860-4496, Fax: 81-29-860-4706, E-mail: Guoping.CHEN@nims.go.jp

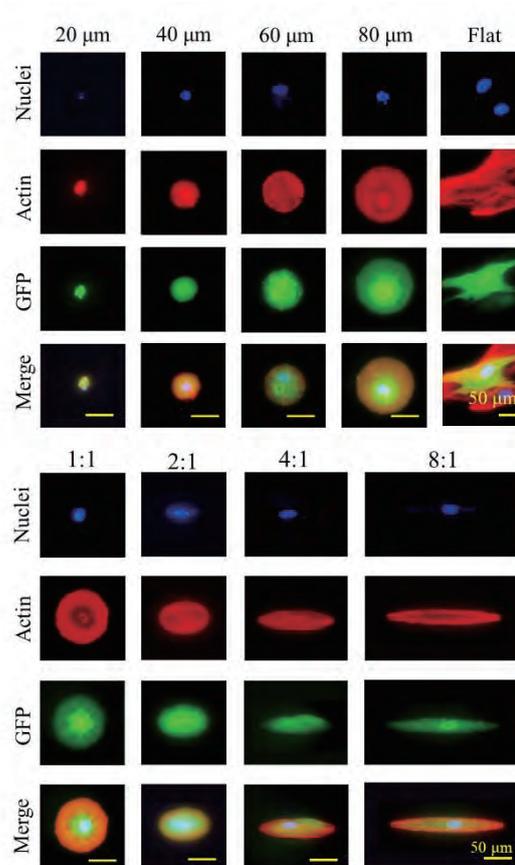


Fig. 1 Representative images of GFP positively expressed micropatterned MSCs with staining of nucleus (blue) and actin (red).

細胞接着性ペプチドをリガンドとした温度制御型細胞分離

¹ 慶應義塾大学大学院薬学研究科○志村 昌紀¹, 花屋 賢悟¹, 蛭田 勇樹¹, 長瀬 健一¹, 金澤 秀子¹

【緒言】

従来の医薬品による治療法が確立していない疾患に対して、細胞を移植する再生医療の発展が期待されている。この再生医療において、特定の細胞を抗体で標識せずに効率よく分離する技術が望まれている。本研究では、細胞の修飾をしない細胞分離を目的として、ガラス基板表面に温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)を修飾し、末端に細胞接着性ペプチドを導入した機能性表面を開発した。温度による細胞の接着性・脱着性を観察する事で細胞分離用基材としての特性を調べた。(Fig. 1)

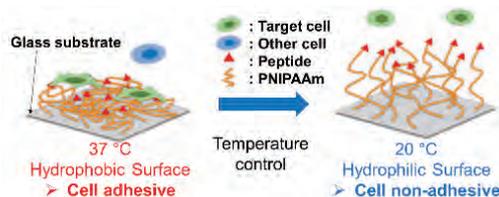


Fig. 1 Cell separation system using thermoresponsive polymer and cell adhesive peptides.

【実験】

Fmoc保護アミノ酸を用いた固相ペプチド合成法により、細胞接着性を有する環状ペプチド c(RGDfK)-N3 を合成した。続いて以下の手順でペプチド導入 PNIPAAm 修飾基板を作製した(Fig. 2)。表面開始可逆的付加-開裂連鎖移動(RAFT)重合によりガラス基板の表面に PNIPAAm を修飾し、末端にアルキン部位を導入した。合成したアジド化ペプチドを用いて、クリックケミストリーとして知られるアジド-アルキンの環化付加反応により PNIPAAm 鎖末端に細胞接着性ペプチドを導入した。作製した基板をペトリディッシュに固定し、ヒト臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hbmMSC)を播種し、37 °C での接着挙動と 20 °C での脱着挙動を観察した。

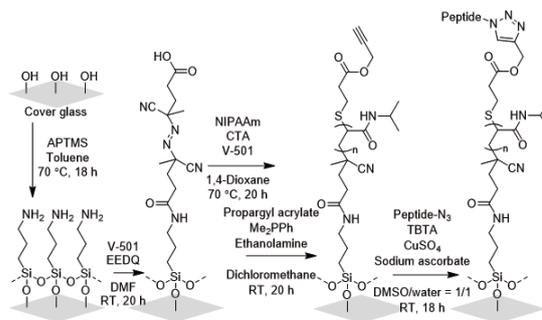


Fig. 2 Scheme for preparation of cell adhesive peptide modified PNIPAAm glass substrates.

【結果と考察】

作製したガラス基板に細胞を播種し 37 °C でインキュベーションしたところ、接着速度は HUVEC よりも MSC の方が大きかった。20 °C でインキュベーションすると、HUVEC は 1 時間程度でほとんどが脱着したのに対し、MSC は脱着が遅いという結果が得られた。また、ペプチド修飾基板は、未修飾基板と比較して高い初期接着速度を示した(Fig. 3)。これらの結果より、PNIPAAm 修飾基板を用いることで、細胞種による脱着速度の差を用いて、温度変化のみによる細胞分離の可能性が示された。細胞接着性ペプチドの修飾により細胞の初期接着速度が増加することで、細胞分離プロセスにかかる時間を短縮することが可能となった。また、細胞選択性を持つペプチドを用いることで、より選択性の高い分離に応用できる可能性が示された。

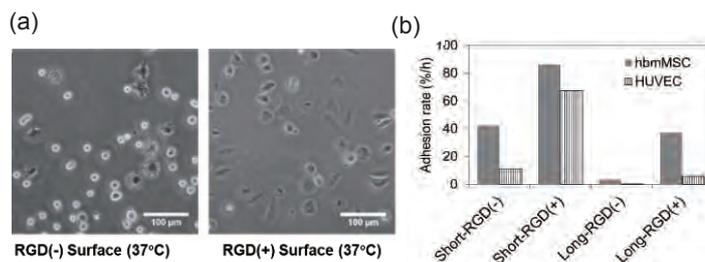


Fig. 3 Cell adhesion behavior on PNIPAAm brush with and without peptide (a), and initial cell adhesion rate on each surface (b).

Temperature-controlled Cell Separation System using Cell Adhesion Peptides

Masaki Shimura¹, Kengo Hanaya¹, Yuki Hiruta¹, Kenichi Nagase¹, Hideko Kanazawa¹¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University

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

ゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞凝集体の振盪培養

¹京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 生体材料学分野, ²東京理科大学薬学部薬学研究科 薬品物理化学研究室

○新居 輝樹^{1,2}, 牧野 公子², 田畑 泰彦¹

【緒言】

細胞を3次元に凝集させた細胞凝集体は、その生物活性が高まることから、再生医療、創薬研究への応用が期待されている。しかしながら、これまでの細胞凝集体に関する研究においては、凝集体内部の環境に対する工夫がなく、凝集体内部への酸素や栄養の供給が悪いことにより、細胞の生存と機能状態がよくないことが問題となっていた。この問題を解決する方法として、細胞になじむ性質をもち、かつ生体吸収性のゼラチンからなるハイドロゲル粒子を作製した。この粒子をマウス頭蓋冠由来株 (MC3T3-E1) 細胞とともに培養することによって、ゼラチン粒子を内部に均一に含む細胞凝集体を作製してきた。本研究では、ゼラチン粒子の量を変化させ、かつ凝集体内部への酸素や栄養の供給状態を改善するために振盪培養法を適用した。これらの工夫による細胞凝集体の機能変化について調べた。

【実験】

ゼラチン(牛骨由来、等電点 5.0、重量平均分子量 1.0×10^5 、新田ゼラチン株式会社から供与)の 10 wt% 水溶液(W)を調製し、それをオリーブオイル(O)中で攪拌することにより、W/O エマルジョンを形成させた。このエマルジョンを 0 °C まで冷却し、ゼラチン水溶液をゲル化させた。その後、冷却アセトンを用いて、未架橋ゼラチン粒子を遠心洗浄により回収した。ゼラチン粒子をシーブ(20, 32, および 53 μm 孔径)により分画、粒子径別に回収した。次に、未架橋ゼラチン粒子を減圧下、140 °C で所定時間、熱脱水処理することにより架橋ゼラチンハイドロゲル粒子を得た。

96well 培養 plate (U 底)の各 well にポリビニルアルコール (PVA、日本酢ビ・ポパール株式会社、重量平均分子量 = 8.8×10^4 、鹼化度 88.0 mol%) のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 (100 μl) を加え、37°C で 15 分間、放置した。その後、PVA 水溶液を吸引除去し、PBS 溶液で 2 回洗浄することで、well 底面の PVA コーティング処理を行った。ゼラチンハイドロゲル粒子を 10 vol % のウシ胎児血清を含有した αMEM (以下、標準培地) 中に懸濁した (0, 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 および 4×10^3 個/ml)。この粒子懸濁液 50 μl と MC3T3-E1 の標準培地懸濁液 (2×10^4 cells/ mL) 100 μl を混合した後、各 well に滴下した。37°C、5% CO_2 の条件下で静置培養し、細胞凝集体を作製した。その後、振盪培養 (30 rpm) もしくは静置培養にて細胞凝集体を培養した。

培養 1、2、および 3 週間後の細胞凝集体に対して、凝集体のサイズを Image J を用いて測定した。加えて、細胞あたりの ATP 量およびミトコンドリア活性を測定した。

【結果と考察】

ゼラチンハイドロゲル粒子と細胞との混合比、振盪培養の有無によらず、U底 well 中に細胞凝集体の形成が見られた。細胞に対するゼラチンハイドロゲル粒子の混合比率が高くなるとともに、細胞凝集体のサイズは大きくなった。また、ゼラチンハイドロゲル粒子を含有した細胞凝集体において、培養2週間まではサイズは変化しなかったが、3週間後ではそのサイズが小さくなった。これは、細胞凝集体内のゼラチンハイドロゲル粒子の分解が影響していると考えられる。ゼラチンハイドロゲル粒子の混合比率が低い場合には、静置培養と比較して、振盪培養された細胞凝集体の細胞当たりのATP量とミトコンドリア活性は有意に高くなった。これに対して、ゼラチンハイドロゲル粒子比率が高くなると振盪培養による影響は見られなかった。これらの結果は、低いゼラチンハイドロゲル粒子比率では、振盪による培養液の動きが、凝集体内の細胞機能に影響することを示している。

Shaking culture of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel spheres.

Teruki Nii^{1,2}, Kimiko Makino², and Yasuhiko Tabata¹

1, Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawara-cho Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

2, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641, Yamazaki, Noda, 8510, Japan
Tel: 075-751-4108, e-mail: niiteruki@gmail.com

マウス頭蓋骨初期石灰化機構を模倣した新規石灰化技術の開発

¹ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野, ² 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野, ³ 岡山大学病院矯正歯科
 ○国富 陽介^{1,3}, エミリオ サトシ ハラ¹, 岡田 正弘¹, 上岡 寛², 松本 卓也¹

【緒言】

近年、生体機能や特性を模倣し工学や医療へ応用するバイオミメティクス(生体模倣)が注目されている。骨誘導材料においても骨組織の構成を模倣した材料の開発が進められている。しかし初期石灰化を模倣した骨誘導材料は未だ開発されておらず、初期石灰化をモノづくりの観点で理解する試みが少ないことがその要因の一つと考えられる。そこで本研究ではマウス頭蓋骨の初期石灰化について注目し、材料学的、形態学的、結晶学的手法と分子生物学的手法とを融合し、頭蓋骨初期石灰化機構の理解を進めた。さらに、今回の研究を通じて得られた知見を応用し、生体外で頭蓋骨初期石灰化を模倣した新規石灰化技術の開発を試みた。

【実験】

胎生 13.5 日から 15.5 日および出生後の ICR マウス頭蓋骨を採取し、マイクロ CT、組織学的染色、走査型電子顕微鏡(SEM)観察により初期石灰化開始時期および部位を同定し、透過型電子顕微鏡(TEM)観察により詳細な構造を確認した。さらに SEM 観察により確認された石灰化小球に対して定量を行うことで経時的な大きさの変化を比較し、電子線回折により定性評価を行った。生体外で初期石灰化組織を作製するため、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を osteogenic medium の条件下で 5 日間培養し、超遠心分離により基質小胞を抽出した。さらに基質小胞を超音波処理により断片化し、コラーゲンゲルと共に α -MEM、10 mM β -glycerophosphate の条件下で 7 日間培養し、組織学的染色、SEM 観察、電子線回折により石灰化組織の定性評価を行った。

【結果と考察】

マイクロ CT、組織学的染色より頭蓋骨の骨発生は胎生 14 日頃に前頭骨および頭頂骨から開始することが分かった。初期石灰化領域では小胞様構造物がみられ、TEM 観察から脂質二重膜様構造を示すことが確認された。さらに石灰化領域では結晶様構造物が存在し、電子線回折よりハイドロキシアパタイトであることが明らかとなり、定量比較結果から経時的な結晶成長が確認された。今回の観察を通じて、マウス頭蓋骨初期石灰化は骨芽細胞からのコラーゲン線維放出、骨芽細胞からの基質小胞放出、基質小胞を元にした結晶成長という 3 段階により進行することが示唆された。この機構を応用し生体外で初期石灰化組織の作製を試みた結果、SEM 観察から結晶様構造物が確認され (Fig. 1A)、電子線回折よりハイドロキシアパタイトであることが示された (Fig. 1B)。今回の研究により、基質小胞およびコラーゲン線維の相互関係を利用し初期石灰化起始点を作り出すことに成功した。今後はより生体組織に近似した骨誘導材料開発のため血管など石灰化周囲組織との関係性を精査し材料開発へ応用する予定である。

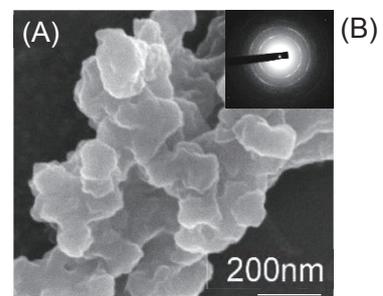


Fig.1 (A) SEM image of the minerals formed inside the collagen gel containing MV nanofragments., (B) Electron diffraction analysis of the minerals showing that the minerals are hydroxyapatite.

Biomimetic mineralization mimicking initial bone formation of mouse calvaria

Yosuke Kunitomi^{1,3}, Emilio Satoshi Hara¹, Masahiro Okada¹, Hiroshi Kamioka², Takuya Matsumoto¹

¹Department of Biomaterials, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan ²Department of Orthodontics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan ³ Department of Orthodontics, Okayama University Hospital, Okayama, Japan

Tel: +81-86-235-6667, Fax: +81-86-235-6669, E-mail: pcb89v5i@s.okayama-u.ac.jp

ヒアルロン酸ナノファイバーシートを足場とした上皮組織細胞の三次元培養

¹東京薬科大学生命科学部, ²東京薬科大学大学院生命科学研究科

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

【緒言】 上皮細胞には扁平・円柱・立方状など様々な形態があり、それらが単層あるいは重層化することで上皮組織を形成している。上皮組織の最下層では、幹細胞性を有する立体的な細胞が分化・増殖することが知られている。*In vitro*で上皮組織を再構築する際、硬い足場上で細胞が伸展しつつ幹細胞性が損なわれる可能性が危惧される。当研究グループでは細胞の伸展を抑制しつつ培養可能な足場として、ヒアルロン酸ナノファイバーシート(HNFS)を開発した(第6回生物工学会コロキウム, 2018)。本研究では、HNFSを足場として正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)の三次元培養を試みた。培養細胞組織の分化増殖状態を蛍光免疫染色法で形態学的に評価し、細胞およびその周囲の微細構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

【実験】 ヒアルロン酸ナトリウム(Mw < 1000k)を化学修飾したのち、ポリエチレンオキシド、ミリQ水、N,Nジエチルホルムアミド混合溶液を加えることで、ヒアルロン酸ポリマー溶液を調製した。この溶液を原料とし、エレクトロスピンニング法によりカバーガラス上に紡糸後、*in situ*架橋した。これをエタノール、ミリQ水および液体培地で逐次洗浄し、HNFSを得た。24ウェルプレートに設置したHNFS上に任意量のNHEKを播種した。培養条件は二酸化炭素濃度5%、37℃、任意の培地中カルシウム濃度(0.06~1.4 mM)とし、1日間または5日間培養した。また、コントロールとしてカバーガラス上に同一条件でNHEKを培養した。各試料は適切な前処理後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で細胞核、アクチンフィラメント、増殖関連タンパク質、分化マーカータンパク質の局在を三次元的に観察した。SEM観察用試料は、t-ブチルアルコールで置換後凍結乾燥し、化学気相蒸着法でオスミウムを被覆した。

【結果と考察】 HNFSに播種したNHEKは培養期間に関わらず、播種時の球体を保ったままシート上層の網目構造内部に包埋されている(Fig. 1B)。細胞とファイバーの接点には、細胞とファイバーが融合している様子が確認できる。NHEKは、表面のヒアルロン酸レセプターであるCD44を介してファイバーをヒアルロン酸として認識しつつ網目構造に沿ってシート内層部へと遊走したことが示唆される。また、ヒアルロン酸を認識することで、ヒアルロン酸の取込・分解と再分泌により細胞とファイバーの融合が生じたものと考えられる。5日間の培養では細胞がファイバーと絡み合いながら三次元的に分裂・増殖しており、一部ではスフェロイド様の組織体形成が確認できる。これらの組織体において顕著なストレスファイバーおよび接着班の形成は認められず、インテグリン分子群を介したシグナルカスケードは抑制されているものと推定する。一方、カバーガラスで培養したNHEK(Fig. 1A)は、分裂・増殖するものの典型的な伸展形態を示し、ストレスファイバー、接着班、仮足の形成が顕著であり、分化ステージの進行が強く示唆される。HNFSを上皮細胞の培養足場として用いることで、組織最下層の幹細胞性を維持し、正常な上皮組織の三次元培養が可能になると期待できる。

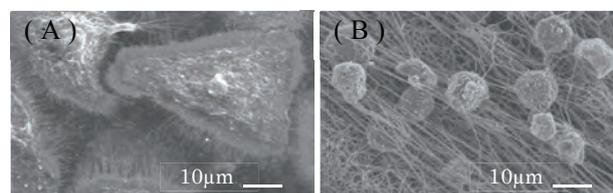


Fig.1.カバーガラス上で1日培養したNHEK(A)とHNFS上で1日培養したNHEK(B)のSEM画像

3D cell culture using hyaluronan nanofiber networks toward epithelium tissue reconstruction

Megumi Kubota¹, Ryuto Kawanishi², Motohide Aoki², Hidetoshi Kumata², Tomonari Umemura², Tatsuya Uchida²

¹Department of Life Sciences Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,

² Graduate School 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

組織接着性を有する温度応答型生分解性インジェクタブルゲルの開発

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大 ORDIST, ³ 関西大医工薬研セ

○藤原 壮一郎¹), 永田 拓也¹), 能崎 優太²), 葛谷 明紀^{1,3}), 大矢 裕一^{1,3})

【緒言】我々はこれまでに、生体外ではゾル（溶液）状態で、生体内に注入すると体温にตอบสนองして *in situ* でヒドロゲルを形成する温度応答型インジェクタブルポリマー (IP) として、ポリ（カプロラクトン-グリコール酸）(PCGA)とポリエチレングリコール (PEG) からなるトリブロック共重合体：PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA (tri-PCG) の医療応用について検討してきた¹⁾。その応用例として、腹腔鏡手術下において使用可能な癒着防止材や、カテーテルを利用して治療目的で一時的に血管を塞栓する材料としての研究を進めている。こうした用途では、形成した IP ゲルが塗布した組織表面から離れると、期待される機能が発揮されないため、組織に適度な強さで接着することが望まれる。しかし、tri-PCG のみでは組織接着性が不足している。そこで、生体組織を構成している細胞表面の膜タンパク質や細胞外マトリックスに存在しているアミノ基と化学的に反応する官能基を IP に導入することを考えた。

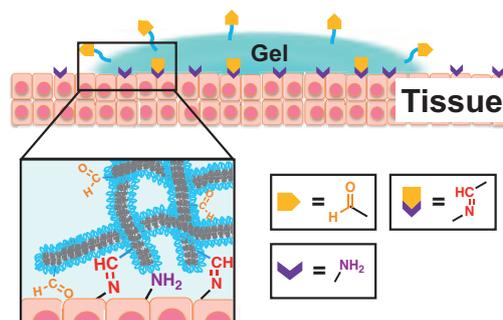


Figure 1. Schematic illustration of tissue adhesion of injectable polymer hydrogel having aldehyde groups.

本研究では、生体内で温度にตอบสนองしてゲルを形成した際にゲル表面に、アミノ基と反応してシッフ塩基結合を形成するアルデヒド基を露出させ、生体接着性を発現するIPを設計した。ここで、tri-PCGは、疎水性部 (PCGAセグメント) をAブロックとした両親媒性 ABA型トリブロックコポリマーであり、単にポリマー末端にアルデヒド基を導入した場合、ミセルコア近傍にアルデヒド基が位置する結果となり、ポリマーネットワークと水相の界面にアルデヒド基を露出させる事ができないと予想される。そこで、親水性セグメントと疎水性セグメントを逆転させた構造のBAB型ポリマーの末端にアルデヒド基を導入することを考えた。今回は、BAB型ポリマーとしてPEGを親水性鎖としポリプロピレングリコール (PPG) を疎水性鎖とした市販の温度応答性ポリマー-Pluronic (PEG-*b*-PPG-*b*-PEG) P-123を使用し、その末端にアルデヒド基を導入したポリマーを合成し、これをtri-PCGと混合することで、組織接着性を付与した温度応答型IP製剤の開発を試みた(Fig. 1)。

【実験】 Pluronic P-123 (PEG 重合度 20, PPG 重合度 70, 分子量 5,800) と terephthalaldehydic acid (TAA)を THF に溶解し、dicyclohexylcarbodiimide (DCC)と dimethylaminopyridine (DMAP)を用いて脱水縮合を行い、アルデヒド基修飾 Pluronic を合成した。アルデヒド基の反応性を確認するため、得られたポリマー(Pluronic-CHO)とアミノ基を有するポリマー(Poly-L-Lysine)を水溶液中で混合した。次に、この Pluronic-CHO を tri-PCG に混合して作成した IP 製剤を食用の豚肝スライスに挟んでゲル化させて固定し、接着面と平行方向にせん断応力をかけて引張試験を行い、破断に至る最大応力の値から組織接着力を評価した。

【結果と考察】 ¹H-NMR の測定結果から TAA の導入率を算出したところ、約 97%であった。Poly-L-Lysine との反応による粘度の増大により、Pluronic-CHO がアミノ基に対する反応性を有していることが確認された。組織接着力の試験により tri-PCG に対する Pluronic-CHO の混合割合を増加させると、接着強度が上昇することが分かった。

【結果と考察】 ¹H-NMR の測定結果から TAA の導入率を算出したところ、約 97%であった。Poly-L-Lysine との反応による粘度の増大により、Pluronic-CHO がアミノ基に対する反応性を有していることが確認された。組織接着力の試験により tri-PCG に対する Pluronic-CHO の混合割合を増加させると、接着強度が上昇することが分かった。

【参考文献】 1) Y. Yoshida, Y. Ohya *et al.*, *Polym J.*, **2014**, *46*, 632-635.

Development of temperature-responsive biodegradable injectable hydrogel system having tissue adhesive property

Soichiro FUJIWARA¹, Takuya NAGATA¹, Yuta YOSHIKAZI², Akinori KUZUYA^{1,3}, Yuichi OHYA^{1,3}
 (¹Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, ²ORDIST, Kansai University, ³CEMP, Kansai University, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan)

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

温度応答性パターン化基材からフィブリンゲルへの連続培養による配向神経筋組織の作製

¹早稲田大学大学院 先進理工学研究科, ²東京女子医科大学 先端生命医科学研究所
○及川 富美子^{1,2}, 高橋 宏信², 清水 達也², 武田 直也¹

【緒言】神経筋疾患の機序解明と治療法確立のためには、生体組織の構造と機能を再現した神経筋組織モデルの開発が求められている。これまでに演者らでは、一方の構成要素の筋組織については、温度応答性パターン化基材を用いて、ヒト筋芽細胞が同一方向に配向・伸展・融合して形成される骨格筋組織を作製することに成功している。次の段階は、神経組織を導入して、神経からの情報によって運動機能が制御される神経と骨格筋の複合組織モデルを構築することである。そこで本研究では、温度応答性パターン化基材による配向化骨格筋組織の作製操作に続いて、ゲル培養を組み合わせる筋組織の成熟化を図るとともに、ここに神経細胞を播種して共培養し、配向化筋組織と神経細胞からなる複合組織の構築を目指した。

【実験】ポリ(*N*-イソプロピルアクリリド) (PIPAAm) が表面に修飾された温度応答性培養皿に、フォトマスクのパターンフィルム (露光 50 μm 幅/遮光 50 μm 幅) を用いて、親水性高分子のポリアクリルアミドを 50 μm 幅のストライプ状に光重合した (Fig.1A)。このパターン化基材にヒト筋芽細胞を播種し、コンフルエントになるまで培養した後にマトリゲル含有のフィブリンゲルで組織を包埋した。次いで、低温化によりゲルごと骨格筋組織を培養皿から回収し、筋芽細胞上にヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を播種して数週間共培養を行った。この系において、筋と神経それぞれの組織の構造や配向性、ならびに神経と筋のシグナル伝達に重要な神経筋接合部 (neuromuscular junction; NMJ) の形成を蛍光免疫染色により評価した。また、骨格筋組織の機能評価として、電気刺激による収縮挙

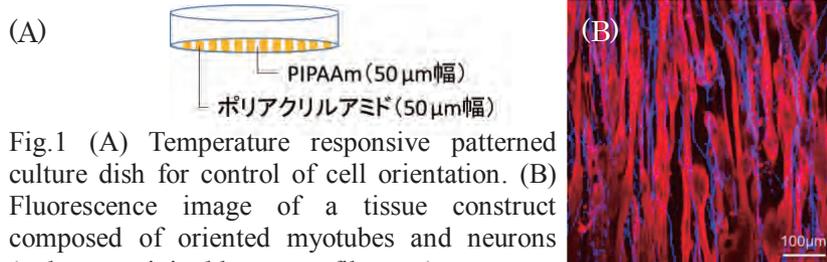


Fig.1 (A) Temperature responsive patterned culture dish for control of cell orientation. (B) Fluorescence image of a tissue construct composed of oriented myotubes and neurons (red: α -actinin, blue: neurofilament).

動を観察した。

【結果と考察】蛍光免疫染色の結果から、筋芽細胞は培養基材のパターンに沿って配向・融合し、同一方向に配向した筋管を形成することが見出された (Fig.1B)。また、マトリゲル含有フィブリンゲルを用いて培養した骨格筋組織はサルコメア構造を有し、膜表面にラミニンの発現も確認され、成熟した組織の形成が示唆された。これらの成熟した組織の形成は、ゲル培養場にマトリゲルを添加することで顕著に促進されることも見出された。一方、神経細胞についても、筋管に沿って神経突起を伸長させる様子が観察された (Fig.1B)。さらに、NMJ において神経細胞からのシグナルを受け取るアセチルコリン受容体 (AChR) が筋管表面に存在することも確認され、運動神経の軸索が AChR に隣接している構造も見られた。これらの結果から、骨格筋組織内に NMJ が形成されたことが示唆された。また、電気刺激 (10 V, 10 ms, 1 Hz) の負荷によって、この神経筋組織が収縮する様子も観察され、生体の構造と機能を模倣した複合組織を構築できたと考えられた。今後、グルタミン酸等により神経細胞のみを刺激しても筋収縮が誘起されるかを評価し、NMJ を介したシグナル伝達能を有するヒト神経筋組織モデルであることを示していく予定である。

Fabrication of combined tissue constructs composed of oriented skeletal muscles and motor neurons by successive cultures using a temperature responsive patterned substrate and a fibrin gel

Fumiko OIKAWA^{1,2}, Hironobu TAKAHASHI², Tatsuya SHIMIZU² and Naoya TAKEDA¹

¹Department of Life Science and Medical Bioscience, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University (TWIns), Tokyo, Japan. ²Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University (TWIns), Tokyo, Japan

Tel&Fax: +81-03-5369-7323, E-mail: takahashi.hironobu@twmu.ac.jp, ntakeda@waseda.jp

マイクロカプセル培養下での生理活性ペプチドの *in situ* conjugation

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
 ○大木 悠一朗¹, 太田 誠一², 大庭 伸介^{1,2}, 伊藤 大知^{1,2}

【緒言】欠損組織に対する前駆細胞の移植による治療は近年注目されている。しかし、実用化には目的組織の細胞への大量の分化が必要であり、現状は分化効率が低い上に高コストである点が課題である。生体内では細胞の機能発現・分化が細胞外マトリクスや液性因子によって制御されていることから、分化段階に応じ微小環境を動的に制御可能な三次元スキャホールド中での培養によって、分化効率を向上できることが期待される。そこで本研究では三次元スキャホールドとしてアルギン酸マイクロカプセルを用い、微小環境を動的に変化させる手段として生理条件下で進行可能なマレイミド・チオール反応を利用した。細胞封入マレイミド修飾アルギン酸(Alg-Mal)カプセルに対しチオール基を持つBMP-2模倣ペプチドを *in situ* conjugation し、動的な骨分化誘導を目指した。

【実験】

2.1 平面培養下でのBMP-2による骨分化誘導

骨分化マーカーであるCol1産生時にGFPを発現する骨前駆細胞MC3T3E1を、維持培地のみ、及びBMP-2含有培地を用いて1週間平面培養した。培養後、フローサイトメトリーによりGFP蛍光強度の定量を行った。

2.2 カプセル培養下でのペプチドの *in situ* conjugation

MC3T3E1を封入したAlg-Malカプセルを作製し、培養した。1日後、チオール基を持つBMP-2模倣ペプチドであるCDWIVA又はCG-BMP-2 knuckle epitope peptide (CG-BMP-2 KE Pep)、チオール基を持たないDWIVA又はBMP-2 KE Pepを添加しさらに6日間培養した。比較対照として維持培地のみ、及びBMP-2を含む骨分化培地を用いた。培養後、フローサイトメトリーによるGFP蛍光強度の定量を行った。

【結果と考察】

3.1 平面培養下でのBMP-2添加による骨分化評価

GFPの蛍光強度は維持培地での培養と比較して、BMP-2の添加により2.1倍まで有意に上昇した。Col1は骨分化マーカーであるため、BMP-2は平面培養下では骨分化を促進することが示唆された。

3.2 Alg-Malカプセル培養下での生理活性ペプチドの *in situ* conjugationによる骨分化評価

Col1産生時に発現されるGFPの蛍光強度をフローサイトメトリーで定量した結果をFig. 1に示した。GFPの蛍光強度はコントロールと比較して、チオール基を持ったBMP-2模倣ペプチドの添加により1.5倍程度まで有意に上昇した。一方でチオール基を持たない2種のBMP-2模倣ペプチドを添加したことによるGFP蛍光強度に有意差は見られなかった。これらの結果より、これらのペプチドの骨分化誘導能をAlg-Malマイクロカプセルに *in situ* conjugation することで付与できることが示唆された。またBMP-2の添加によるGFP蛍光強度に有意差が見られなかったことからBMP-2がカプセル内へ拡散する前に失活した可能性が考えられる。以上より、本培養システムにおいて、様々な生理活性ペプチドを添加することでカプセル内へと拡散し *in situ* conjugation による細胞の機能発現・分化制御が期待できると考えられる。

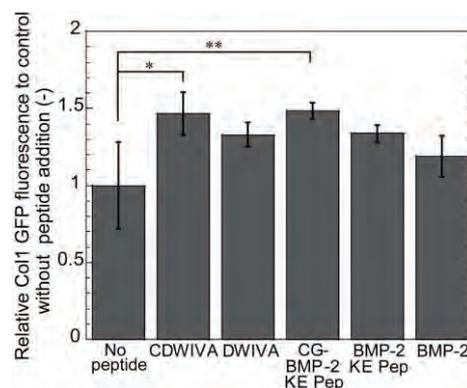


Figure 1. Effect of *in situ* conjugation of bioactive peptides on encapsulated-cell differentiation by flow cytometry. (N= 4, **: p < 0.01, *: p < 0.05)

In situ conjugation of bioactive peptides in microcapsule culture

Yuichiro Oki¹, Seiichi Ohta², Shinsuke Ohba^{1,2}, Taichi Ito^{1,2}

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

Tel: +81-3-5841-1425, Fax: +81-3-5841-1697, E-mail: taichi@m.u-tokyo.ac.jp

毛包原基を用いた皮膚組織の作製

¹横浜国立大学大学院・工学府, ²神奈川県産業技術研究所
○楯 芳樹¹, 景山 達人^{1,2}, 福田 淳二^{1,2}

【緒言】

我々の体表面を覆う皮膚は、表皮と真皮、毛包や皮脂腺などの皮膚付属器により構成され、表皮のバリア機能に加え、毛髪による紫外線からの保護や皮脂や汗による水分調節など様々な器官が関わって機能している。再生医療の分野では、表皮と真皮の2層構造を生体外で再現した培養皮膚と呼ばれる組織構築技術が開発され、薬物の透過性や刺激などを簡潔に予測できる画期的なツールとして製薬企業などで利用されてきた。しかし、従来の培養皮膚は皮膚付属器を含んでおらず、皮膚本来の機能を十分に発揮することが不可能であった。一方、我々は、皮膚付属器の1つである毛包の原基を大量調製する技術を開発し、これをマウスに移植することで毛周期を繰り返す毛髪が再生できることを示してきた (T. Kageyama et al. *Biomaterials*, 154, 291-300, 2018)。本研究では、この毛包原基を皮膚組織作製時に導入することで、皮膚付属器を備えた皮膚組織の構築を目指した。

【実験】

マウス皮膚から採取した上皮系細胞と間葉系細胞を1:1の比率で混合し、 2×10^4 cells/well ずつ細胞非接着丸底ウェル培養器に播種した。2種類の細胞は、1つの凝集体を形成した後、3日間の培養中に自発的に凝集体内で分離することで、毛包原基を形成した。この毛包原基50個を、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を含む細胞懸濁液に混合し、セルカルチャーインサートに播種し、1日培養することで毛包原基を含むシート状組織を作製した。続いて、皮膚付属器を備えた皮膚を再生できるかを評価するために、チャンバー法によるマウスへの移植を行った。すなわち、ヌードマウスの背部皮膚を丸く切りとり、シリコン製の円筒チャンバー(直径7.0 mm、高さ7.5 mm)を取り付けることで移植床を作製し、そこに作製した培養皮膚を移植した。

【結果と考察】

培養器に播種した2種類の細胞は1日目に1つの凝集体を形成した後、3日間の培養で2種類の細胞が凝集体内で分離した毛包原基構造を自発的に形成する様子が観察された。発生過程の毛包原基は、毛包形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)が間葉系細胞において発現することが知られている。作製した毛包原基でALPの発現を評価した結果、発生初期と同様に、間葉系細胞においてALPの発現が確認された。

移植4週間後には毛髪を有する皮膚組織の構築が確認された。移植皮膚切片の組織染色の結果より、再生した皮膚内に毛包の形成が観察され、毛幹が表皮を貫通している様子も確認された。再生した毛幹を走査型電子顕微鏡で観察すると、生体の毛幹と同様に特徴的なキューティクル構造を有していた。本実験で調製した毛包原基は未分化性の高い胎児皮膚由来の細胞を使用している。そのため、発生過程と同様の上皮-間葉相互作用により、毛髪の再生も構築されたと考えられる。

Biomaterials: Engineering skin tissue constructs with hair follicles germ

Yoshiki Tate¹, Kageyama Tatsuto^{1,2}, Junji Fukuda^{1,2}

¹Faculty of Engineering, Yokohama National University

²Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology

Tel: 045-339-4008 Fax: 045-339-4008, E-mail: fukuda@ynu.ac.jp

塗布ピン方式による微細塗布装置を用いた心筋組織の作製

¹NTN 株式会社 商品開発研究所, ²大阪大学大学院 生命機能研究科
 ○近江 祥平^{1, 2}, 山中 昭浩¹, 小田 淳志^{1, 2}, 中村 陽香¹, 赤木 隆美², 明石 満²

【緒言】

細胞操作により生体組織を人工的に構築した三次元組織モデルは、再生医療への応用や動物実験に替わる新たな創薬支援ツールの開発、および生命科学の基礎研究など広い用途で求められている。これまでに三次元組織の作製方法に関して、細胞をシート状に培養・剥離し積層する方法、スキャホール・ハイドロゲルを用いた立体培養など様々な取り組みが行われている。その中でも3D プリンター技術は、各々の細胞を立体的に的確な位置に高速かつ微細に配置できることから、細胞の立体造形技術として注目されている。その方法として、ディスペンサー方式、インクジェット方式、レーザーによる細胞転写方式、およびこれらを複合した技術が開発されており、細胞や足場材料の造形に使用されている。NTN はこれまでに、液晶ディスプレイに用いるカラーフィルタの欠陥修正用として塗布ピン方式による微細塗布装置 (Fig. 1) を開発してきた。この装置は高粘度材料を高い位置精度で微細に塗布できることから、3D バイオプリンターへの展開が期待される。本研究では、本装置を用いてゲル化剤を含む細胞懸濁液の定点配置により組織チップを作製し、新たなバイオプリンターとしての適応性について検討した。

【結果・考察】

微細塗布装置を用いて線維芽細胞を塗布した結果、塗布前後で細胞の生存率に大きな変化は見られず、数日後には細胞が基板に接着し増殖している様子が確認された。また、フィブリンゲル (フィブリノゲン、トロンビン) をハイドロゲルとして使い、iPS 細胞から分化させた心筋細胞 (hiPS-CM) を塗布したところ、数日後に拍動が確認された (塗布径: 約 300 μm)。従来の微細塗布装置は、1本のピンでフィブリノゲンを含む細胞分散液のみを塗布する1ピン方式であったが、トロンビンも塗布可能な2ピン方式を新たに開発し、2液を塗布する場合のそれぞれの量や位置、時間間隔を自由に設定可能にした。また、これまでの塗布ピンでは深いウェルの底面には塗布できなかったが、塗布ピンの長さや塗布機構を改良して、細胞培養用マイクロプレートへの細胞塗布を可能にした。今回は微細塗布装置を用いて、hiPS-CM を塗布する際に添加するゲル化剤に関する検討結果を報告する。

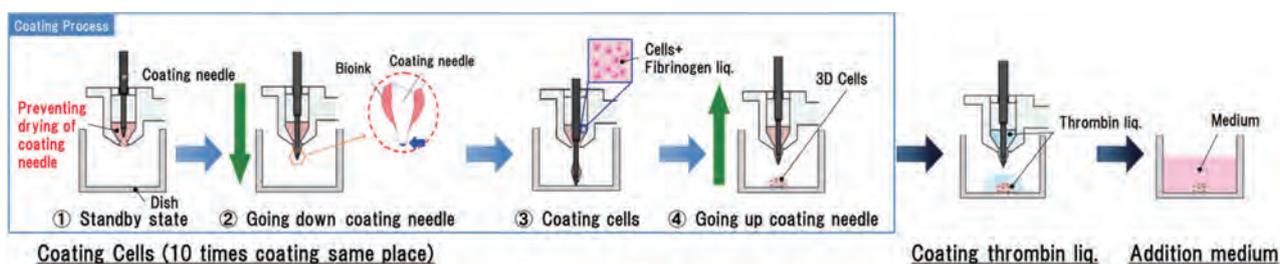


Fig. 1: Process of cell coating in microwell using Microscopic Coating Applicator by coating needle.

Construction of cardiomyocyte tissue chips using Microscopic Coating Applicator by coating needle
 Shohei CHIKAE^{1, 2}, Akihiro YAMANAKA¹, Atsushi ODA^{1, 2}, Haruka NAKAMURA¹, Takami AKAGI², Mitsuru AKASHI²

¹NTN Corporation, ²Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

E-mail: shouhei_chikae@ntn.co.jp

アルギン酸コンポジットを用いた三次元組織培養基材の開発

¹上智大学大学院 理工学研究科

○佐々木 寧音¹, 伊澤 恵子¹, 神澤 信行¹

【緒言】 Beta-tricalcium phosphate (β -TCP)は生体親和性を持ち、骨修復基材などの医療用デバイスの材料として注目されている。これまで当研究室では、繊維状 β -TCP と carbon beads が焼結してできるポアから成り、生体骨に近い構造をもつ骨代替材料(β -TCP-fiber scaffold; β TFS)の開発を行ってきた。しかし、繊維状 β -TCP は強度が低く、培養において溶解度の制御と強度の維持が課題となっている。そこで本研究では、食品添加物のゲル化剤などに利用される天然多糖類であるアルギン酸ナトリウムを用いて、 β TFS の強度を高めた培養基材 β TFS-Alg の作製方法を検討した。アルギン酸ナトリウムの細胞接着性は低い一方、 β -TCP の生体親和性は高いことが分かっている。そこで β TFS にアルギン酸ナトリウムを浸透させ、ゲル化による繊維の補強を考えた。 β -TCP から溶出した Ca^{2+} とアルギン酸が反応し、scaffold の一部にアルギン酸ゲルが生成することが考えられる。この生体親和性の異なる 2 材料を組み合わせることにより、 β TFS の強度を補強するのに加えて、ポア構造により細胞が生育しやすい環境を整え、細胞接着性を向上させた新規の足場材料になることが期待できる。今回 β TFS-Alg の作製方法を確立し、細胞増殖性をはじめとする評価を行った。発表では、コンポジット材の詳細な解析結果を報告する。

【実験】はじめに、使用するアルギン酸ナトリウムがマウス由来骨芽細胞様樹立細胞株 MC3T3-E1 細胞に与える毒性を細胞増殖率により評価した。濃度 0.25-2% (w/v)のアルギン酸ナトリウムを β TFS に十分量浸透させることで作製した β TFS-Alg に対して、SEM による構造観察を行い、培養前後での変化を比較した。次に、 β TFS-Alg 内で細胞を一定期間培養し、培養後の β TFS-Alg に対して細胞局在および増殖率を蛍光染色により観察した。さらに、 β TFS-Alg 上で培養した細胞について、遺伝子発現解析により細胞の骨分化評価を行っている。

【結果と考察】 本研究では β TFS の強度を補強するためにアルギン酸ナトリウムを用い、様々なコンポジットを作製し評価を行った。その結果、アルギン酸ナトリウムを用いることで、細胞培養に必要な期間において強度を維持することができ、 β TFS の脆さを補う新たな足場材料を作製することができた。直径張力強度を測定した結果、添加するアルギン酸濃度が高いほど高い強度が得られることが分かった。SEM での構造観察では、細胞が侵入・接着・増殖するために必要なポア構造と繊維の絡み合いに加えて、アルギン酸によるものと思われる膜状構造が観察された。細胞毒性評価の結果、アルギン酸ナトリウムの濃度や粘性によって増殖率に差があり、 β TFS-Alg 内での増殖に影響を与える可能性が示された。蛍光染色では細胞は β -TCP 繊維上やポアの外周で観察され、日を追うごとに細胞数が増えていく様子が見られた。このことから、アルギン酸ゲル自体には細胞は接着しないが、細胞との親和性の高い β -TCP を原料とした β TFS との組み合わせにより、scaffold 内で細胞の生育に適切なポア環境を整えることができたと考えられる。遺伝子発現解析より、 β TFS-Alg 内で細胞が骨分化していることを示すことができれば、組織培養基材としての展開も可能であると考えている。以上の結果より、三次元細胞培養の足場材料に対し、アルギン酸ナトリウムをコンポジットとして用いる本研究は新規であり、三次元組織培養に向けた足場材料開発の新たな可能性が広がった。

Mechanical and biological properties of alginate-coated beta-tricalcium phosphate-fiber scaffold.

Nene Sasaki¹, Keiko Izawa¹ and Nobuyuki Kanzawa¹

¹Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University,
7-1, Kioi-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8554, Japan

Tel: +81-3-3238-3363, Fax: +81-3-3238-3361, E-mail: ne.on_909@eagle.sophia.ac.jp

細胞構造体の凍結保存を可能にする両性電解質高分子を用いたガラス化液の開発

¹北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス, ²澁谷工業株式会社
○畠山 翔¹, 寺井 渉², 上田 浩司², 松村 和明¹

【緒言】

近年、再生医療分野において幹細胞から分化させた細胞を人体に移植することで、欠損した身体部位や重篤な疾患に犯された臓器を補填することができると期待されている。これを実現するために、細胞や組織の輸送や貯蔵が必要不可欠であり、細胞および組織を長期的に保存するために凍結保存技術の確立が求められている。二次元、三次元の高次細胞構造体を凍結保存する場合、高い生存率の維持が課題となっている。細胞を凍結保存するために、氷結晶が成長すると細胞膜が損傷し、細胞死に至る恐れがある。氷結晶の成長を抑制するために、細胞懸濁液を急速に凍結することで細胞内外の水をアモルファス状態で固化させるガラス化凍結法が用いられる。ガラス化を安定させるために、ガラス化液成分としてエチレングリコール(EG)やジメチルスルホキシド(DMSO)などが用いられる。それらは高濃度で使用すればするほど、氷結晶の成長抑制能が高くなるが、同時に細胞への毒性も高くなる。他にも細胞の分化への影響や浸透圧毒性が懸念される。本研究室では新規ガラス化液成分として氷結晶を抑制しつつ分化への影響が少ないという特徴を持つ両性電解質高分子を用いた[1]。これを用いることで従来のガラス化液成分の濃度を下げることが可能となり、凍結した際の高次細胞構造体の生存率が向上すると考えられる。

【実験】

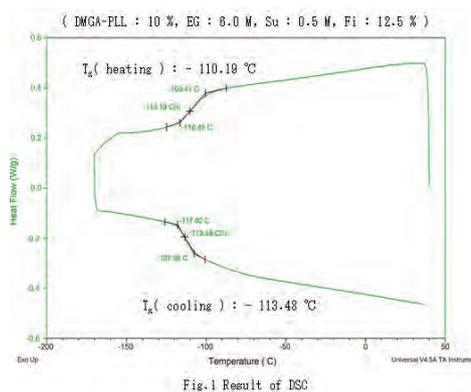
ガラス化安定効果のある両性電解質高分子は、2種類作製した。ポリリジン 25%溶液(PLL)と無水コハク酸(SA)または無水ジメチルグリコール酸(DMGA)を70°Cで1時間攪拌することでコハク酸導入ポリリジン(SA-PLL)およびジメチルグリコール酸導入ポリリジン(DMGA-PLL)を合成した。合成したポリマーとエチレングリコール(EG)、スクロース(Su)、フィコール(Fi)を混合しガラス化液を作製した。作製したガラス化液を用いて、ヒト間葉系幹細胞スフェロイドを-150°Cで冷却し、ガラス化させた後、37°Cの培地で急速に解凍した。トリパンブルー染色と細胞融合によって生存率を評価した。示差走査熱量計(DSC)を用いて、10°C/minで室温から-170°Cまで温度降下および再度室温まで昇温したときのガラス化液のガラス転移点および結晶化/再結晶化の有無を測定した。

【結果と考察】

DSCを用いてガラス化液の結晶化/再結晶化の有無を確認した。EG 6.0M, Su 0.5M, Fi 12.5%の溶液およびそれにSA-PLLを10%添加した溶液では昇温時に結晶化が見られた。しかし、EGの濃度を6.5Mとしたときには結晶化は見られなかった。一方でEG 6.0M, Su 0.5M, Fi 12.5%の溶液にDMGA-PLLを10%添加した溶液(Fig. 1)では、結晶化は見られず、より高いガラス状態の安定性が確認された。これらの溶液と既存のガラス化液のDAP213についてスフェロイドの融合評価を行った。DAP213のスフェロイドは融合せず、well内で浮遊していたため細胞は死滅したと考えられる。高分子を用いた溶液でガラス化させたスフェロイドは融合していたため細胞は生きていると考えられる。

【参考文献】

[1]Matsumura K., et al., ACS Biomater Sci Eng, 2, 1023-1029, (2016)



Development of vitrification solution with polyampholytes which enables cryopreservation of tissue-cell constructs.

Sho Hatakeyama¹, Wataru Terai², Hiroshi Ueda², Kazuaki Matsumura¹

¹School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology ²Regen. Med. Manufact. Sys. Div Shibuya Corp. ¹Tel: +81-7-6151-1680, E-mail: mkazuaki@jaist.ac.jp

無血清培養用の完全合成足場の開発とその細胞選択接着性

AGC 株式会社 商品開発研究所

○朱 麗君, 山本 今日子

【緒言】再生医療や創薬分野で細胞を利用するためには、“数”と“細胞純度”が重要である。近年、均質な細胞を安定して大量調製する組織工学的視点からのアプローチによる培養または評価用部材開発が進んでいる。そのうちの一つは細胞接着活性を有する培養足場であり、接着性細胞である多能性幹細胞と幹細胞由来の組織細胞を培養するために必要とされている。現在、ウシ胎仔血清含有培養液、フィーダー細胞、異種動物由来の細胞外マトリックスタンパク質などを使用し足場を確保しているのが一般的であるが、このような生物由来物質はバッチ変異、免疫応答及び生物由来特融の冷蔵保存期間の制限を受けやすい問題がある。合成培養基質を無血清培地とともに用いればこれらの問題の回避が期待でき、再生医療分野での“安全性”も担保できる。

しかしながら生物由来の接着足場の多くはどんな細胞でも接着させてしまい、再生医療において求められる“細胞の純度”というニーズを満たすのは非常に難しい。本研究では、無血清培地で特定の細胞の接着を促進させる接着足場の開発を行い、細胞またはタンパク質との相互作用を起こす様々な完全合成ポリマーの細胞接着性を評価した。

【実験】溶液重合によって得られた人工合成ポリマーをガラス基板上にスピコーティングしてポリマー膜を作製した。リファレンスとしてRGDペプチドを含有する接着足場を使用した。作製した表面にヒトiPS細胞、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)、ヒトiPS細胞由来心筋細胞 (CMs) をそれぞれ播種し、血清含有または無血清培地で数時間培養した後に細胞を撮影し、CCK-8キットを用いて接着している細胞数を計算した。さらに細胞画像解析により細胞接着に関する特徴値の比較を行った。また、表面特性と細胞接着性との相関性を検証するために、ポリマー膜の各種表面物性を評価した。

【結果と考察】血清含有と無血清培地でポリマー足場へ接着している細胞数を比較すると、血清含有培地のポリマー表面の接着細胞数は無血清条件より多く、血清の有無によって細胞接着の機構が異なることを確認した。

無血清条件では、一部のポリマーで優れた細胞接着能を有するものがあった。細胞接着挙動を観察したところ、RGDペプチド含有リファレンスには3種類の細胞ともよく伸展し接着していたが、ポリマーAではhMSCのみ、ポリマーBではCMsのみよく接着していることがわかった (Fig. 1)。ポリマーAおよびBは室温保管が可能であり、リファレンスと比較して貯蔵安定性にも優れている。

これらの結果から選択的に特定の細胞を接着させるポリマー設計が可能であり、無血清培養条件において完全合成足場として利用できると考えられる。均質な細胞の安定調製に有用である可能性が見出された。

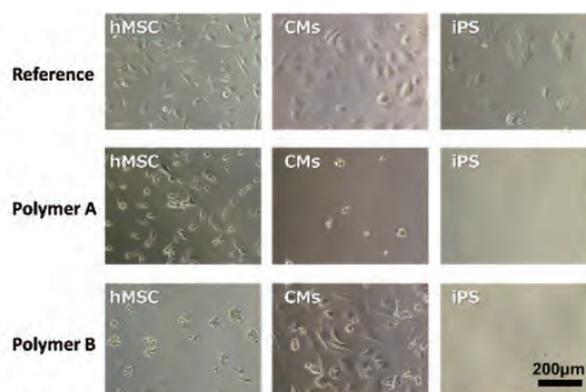


Figure 1 Adhesion of hMSC, CMs and iPS cells onto reference and polymer substrates. The cells were cultured for 4 hours.

Screening of cell-selective adhesion synthetic substrates for serum-free culture

Lijun Zhu, Kyoko Yamamoto

AGC Inc. New Product R&D Center

Tel: +81-45-374-7893, Fax: +81-45-374-8731, E-mail: lijun.zhu@agc.com

脂肪再生可能な吸収性埋入材料の検討

¹京都大学医学研究科形成外科, ²関西医科大学形成外科, ³グンゼ株式会社 QOL 研究所
○荻野 秀一¹, 森本 尚樹², 山中 浩気¹, 坂本 道治¹, 坂元 悠紀³

【緒言】外傷後、腫瘍切除後、先天性疾患による変形を持つ患者さんにとって、軟部組織欠損を再建することは重要である。乳癌患者数の増加とともに、乳房再建の需要が高まっている。現在、乳房再建は、シリコンインプラントなどの人工物埋植、腹部や背部などからの自家組織移植、脂肪移植などが行われているが、人工物による合併症、自家組織の犠牲、脂肪生着不良など各々に問題がある。一方、細胞、細胞成長因子、足場材料を併用することで脂肪再生が可能であるが、乳癌術後の再建では細胞や細胞成長因子使用の安全性は確立されていない。我々は、非吸収性のポリプロピレンをメッシュ状の外殻としコラーゲンスポンジ(CS)封入することで内腔を維持すれば、細胞や細胞成長因子を用いなくても生体内で脂肪が形成されることを、白色家兎を用い明らかにした。その上で、後日抜去の必要のなり吸収性材料であるポリ L 乳酸(PLLA)をメッシュ状の外殻としCS封入することで生体内に脂肪が形成されることを、ラットを用いた検討で明らかにした。今回、埋入後2年までの結果を観察するため、白色家兎を用い PLLA を用いた埋入材料で更に脂肪再生について検討した。

【実験】 PLLA 糸から作製したラグビーボール型の PLLA mesh に CS を封入した CS 封入 mesh implant(長径 30mm 短径 20mm)と、PLLA sheet から作製した PLLA cup(1mmの小孔を多数持つ cup 状外殻:長径 30mm 短径 20mm) に CS 封入する、しない 2 群の implant を作成した。白色家兎単径部に以下の処置を行った。手術処置を行わない control 群、切開し implant を埋入せず創閉鎖した sham-operation 群、3 種類の implant をそれぞれ埋入した CS 封入 mesh 群、CS なし cup 群、CS 封入 cup 群の 5 群(N=5)を作成し、白色家兎単径部皮下脂肪形成を比較した。埋入 12、24 か月後に組織採取し、脂肪重量、体積、埋入物内腔の組織断面積、脂肪組織断面積を比較した。

【結果と考察】重量、体積は、12 か月で CS 封入 cup 群が重量、体積ともに control 群と sham-operation 群より大きかった。(P<0.01) CS なし cup 群も重量、体積ともに control 群と sham-operation 群より大きかった。(重量:共に P<0.01、体積:各々P<0.01、P<0.05) 24 か月では、重量、体積ともに CS 封入 mesh 群が control 群、sham-operation 群(各々P<0.01、P<0.05)より大きかった。埋入物内腔の組織、脂肪組織断面積では、12、24 か月ともに、CS 封入 mesh 群、cup2 群の 3 群間に有意差を認めなかった。cup、mesh implant はともに埋入後 12 か月で内腔に脂肪が再生された。24 か月で、CS 封入 mesh が採取組織の重量・体積が最も大きく、mesh 内腔に脂肪を確認できた。以上より、mesh 形態の PLLA の外殻に CS を封入した形態が最も脂肪形成に有用な材料であると考えられた。今後、より大きな脂肪再生を得るため豚などの大型動物を用い検討を行う予定である。

Development of a bioabsorbable implant to enable the regeneration of adipose tissue *in vivo*

Shuichi Ogino¹, Naoki Morimoto², Hiroki Yamanaka¹, Michiharu Sakamoto¹, Yuki Sakamoto³

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

²Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University

³Gunze QOL Research Center Laboratory

Tel: +81 75 751 3613, Fax: +81 75 751 4340, E-mail: m00w0183@kuhp.kyoto-u.ac.jp

アテロコラーゲン膜セルカルチャーインサートの特性評価

株式会社 高研 研究所
○東 大樹, 勢村 加容子, 藤本 一朗

【緒言】

新たな細胞培養の研究分野において、細胞外マトリクス (ECM) の機能を模倣し、生体内環境を再現できる細胞培養材料が求められている。その中でコラーゲンは ECM の主成分で、生体適合性、生分解性に優れたバイオマテリアルである。特にアテロコラーゲンはコラーゲンのテロペプチド部位を除去して抗原性を低減し安全性を高めた物質である。また近年、培養器具としてポリカーボネート製セルカルチャーインサートを用いることにより、膜を通した細胞間相互作用やホルモン・成長因子等の分子の薬物輸送研究も進んできた。そこで今回、我々はこのアテロコラーゲンを線維化し膜状に加工したコラーゲン膜のセルカルチャーインサートを作製し、その膜の形態、物質透過性を評価したので報告する。

【実験】

アテロコラーゲン酸性溶液とリン酸緩衝生理食塩水を混合して調製したコラーゲン中性溶液を成型容器に流し込み、線維化工程、乾燥工程、架橋工程、脱塩・脱水工程、乾燥工程にて線維化コラーゲン膜を得た。作製した膜の表面構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。線維化コラーゲン膜をセルカルチャーインサートのフレームに固定し、膜の物質透過性するため、膜上部から評価物質 (FITC-Dextran : 4~70 kDa, BSA : 70 kDa, IgG : 155 kDa, Thyroglobulin : 660 kDa) を加え、任意の時間、37°C でインキュベート後、膜下部より検出される評価物質の濃度から透過率を算出した。

【結果と考察】

作製した線維化コラーゲン膜は、SEM による形態観察で、およそ ϕ 0.05~1.0 μ m のコラーゲン線維がランダムに配向した構造であり、隣接する線維間には隙間があることを確認した。そして、透過性試験の結果より、各評価物質を膜上部に加えてから 48 時間後の透過率は、FITC-Dextran (4~70 kDa) では 70%以上、BSA (70 kDa)、IgG (155 kDa)、および今回の検討で最大の分子サイズである Thyroglobulin (660 kDa) のいずれにおいても 70%以上を示した。作製した線維化コラーゲン膜のセルカルチャーインサートは、ホルモンなどの高分子でも膜透過性が高く、細胞間相互作用の解析に有利な細胞培養材料であることが期待される。また、この膜は他の物質を混合することなく生体適合性の高いアテロコラーゲンのみで構成している特徴をもつため、生体移植への使用にも期待ができる。細胞を用いた実験を実施し、合わせて報告する。

Characterization of atelocollagen membrane cell culture inserts

Daiki Higashi, Kayoko Semura, Ichiro Fujimoto

KOKEN Research Center, KOKEN Co. Ltd., Tokyo, Japan.

Tel: 03-5914-2540, Fax: 03-5914-2670, E-mail: daiki.higashi@kokenmpc.co.jp

電気・引張変形刺激を複合的に印加するための導電性高分子を用いた柔軟な細胞培養基材

¹慶應義塾大学 理工学部機械工学科, ²慶應義塾大学 大学院理工学研究科
○宮田 昌悟¹, 志楽 英之²

【緒言】

神経細胞の一種である運動ニューロンや心筋細胞は、電氣的刺激および引張刺激を常に受けながら活動する環境下であり、身体の動作に必要な不可欠な働きを担っている細胞である。これらの細胞の疾患は生命維持に重大な影響を与えることが多い。疾患の機序の解明や治療薬の開発は極めて重要であり、細胞を用いた生体外での疾患モデルや創薬スクリーニングデバイスに関するニーズが高まっている。

そのような背景から本研究では、生体組織工学的手法を用いて、生体外にて生体組織の置かれている環境を模擬して疾患モデルとしたり薬効評価を可能とするデバイスに注目した。特に、引張変形と電気刺激に曝される神経細胞や筋系細胞を対象として、導電性および柔軟性を有する培養基材を開発し、これを用いて神経モデル細胞に電気刺激および引張刺激を印加した。

【実験】

本研究では、導電性高分子でかつ生体適合性を有するポリエチレンジオキシチオフェン(PEDOT)をポリジメチルシロキサン(PDMS)に転写することで、柔軟性を有した PEDOT-PDMS 電極を開発した。さらに同材料を培養基材として、引張刺激と電気刺激を同時に印加可能な培養装置を開発した。

神経モデル細胞としてラット副腎髄質由来褐色細胞種(PC12 細胞)を用いて、ひずみ 1%、周波数 0.5 Hz の繰り返し引張変形と 400 mV/mm, 0.5 Hz の電気刺激を複合的に印加して、3 日間培養した。培養された神経モデル細胞の分化率、生存性、神経突起の伸展方向に与える影響を評価した。

【結果と考察】

開発した培養基材上で引張変形、電気刺激を印加しても PC12 細胞は生存性を維持することが認められた。また、細胞の神経突起の伸展状況から神経細胞分化を評価したところ、電気刺激によって分化が促進されることが明らかとなった。さらに、引張変形刺激と電気刺激を複合的に印加することで、神経突起の伸長方向が配向した。

これより、導電性のある柔軟な培養基材を用いることで、電気刺激による神経細胞分化の促進と引張刺激による神経突起の伸長方向の制御が可能であることが示された。

Elastic Cell Culture Substrate Consist of Conductive Polymer for Electric-Tensile Combined Stimuli
Shogo Miyata¹, Hideyuki Shiraku²

¹Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University, ²Graduate School of Science and Technology, Keio University

Tel: +81-45-566-1141, Fax: +81-45-566-1495, E-mail: miyata@mech.keio.ac.jp

肝細胞シート組織からの血管新生因子分泌を誘導するための核酸送達

¹東京女子医科大学 先端生命医科学研究所, ²梨花女子大学校 薬学部
○小林 純¹, Hyukjin Lee², 大和 雅之¹, 岡野 光夫¹

【緒言】我々は、温度応答性培養皿を利用して肝細胞シート組織を作製し、*in vitro*での肝培養組織および*in vivo*での異所的肝組織構築に取り組んでいる。移植した肝細胞シート組織が肝臓以外の異所的部位（皮下）に生着すると、血友病や $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症など先天性疾患に対しての凝固因子や酵素の補充療法の効果があることを示してきた。ただし、皮下組織は毛細血管等の血管が発達していないため、移植した肝細胞シートは生着できず、移植数週間後に壊死してしまう。そこで、予め塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放デバイスを皮下移植して毛細血管を誘導させると、移植した肝細胞シート組織はうまく生着する。ただし、bFGF徐放デバイスおよび肝細胞シートのための移植を少なくとも2回行う必要があり、侵襲的な手法である。そこで本研究では、肝細胞シート自身が血管新生因子を分泌し、血管新生を誘導するための手法を開発する。具体的には、肝細胞シート組織に血管内皮細胞増殖因子（VEGF）をコードしたプラスミド DNA あるいはメッセンジャー RNA をトランスフェクションし、肝細胞シート自身が分泌する VEGF により血管新生誘導および生着することを目指す。ここでは、初代培養肝細胞に対するトランスフェクション効率を評価するため、緑色蛍光タンパク質 GFP をコードしたプラスミド DNA および mRNA を用いた予備検討を報告する。

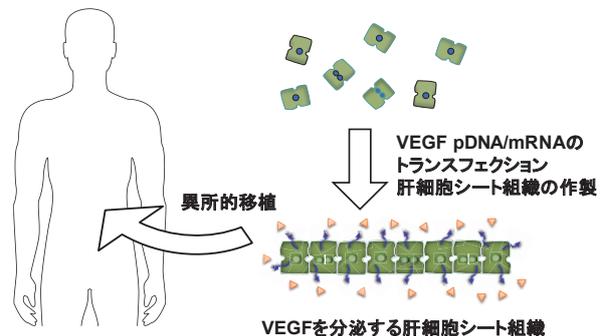


Figure 1 Schematic of ectopic transplantation of hepatocyte sheets secreting VEGF.

【実験】293FT細胞に対し、Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)をコードしたプラスミド DNA (pcDNA3-EGFP, addgene, #13031)を電ポレーション法により導入した。プラスミド DNA 導入後の293FT細胞を培養皿上で24時間培養後、WST-1による細胞生存率を計測し、フローサイトメトリーを用いてEGFP陽性細胞率を解析した。また、8~12週齢の雄ラットから採取した初代肝細胞に対してもプラスミド DNA を導入し、コラーゲンコート培養皿上で24時間培養後、上述と同様の手法で解析を行った。さらに、プラスミド DNA を線状化し、PCRによりEGFPをコードする部分を増幅し、*In vitro transcription*によりEGFP mRNAを合成した。市販のLipofectamine 2000を利用して、コラーゲンコート培養皿上のラット肝細胞に対して、合成したEGFP mRNAのトランスフェクションを行い、EGFP陽性細胞率を解析した。

【結果と考察】電ポレーション法による293FT細胞へのpDNAトランスフェクション条件の最適化を行った結果、約50%の生存率で、EGFP陽性率が約50%を示した。一方、ラット初代肝細胞に対するトランスフェクションを行ったところ、EGFP陽性率が最大でも約1%程度であり、きわめて低い導入率であった。つまり、293FT細胞などの増殖性細胞には高い導入率、初代肝細胞などの非増殖性細胞には低い導入率となった。また、今回用いたプラスミド DNA (pcDNA3-EGFP)のEGFP発現効率が低いので、より発現効率が高いプロモーター配列を有するプラスミド DNA を用いれば、EGFP発現効率が向上すると考える。さらに、肝細胞に対するLipofectamine 2000によるEGFP mRNAトランスフェクションでは、さらに低いEGFP陽性率であったため、今後の改善が必要である。発表当日は、EGFP発現効率が高いプラスミド DNA、VEGFをコードしたプラスミド DNA を用いたトランスフェクション結果についても報告する予定である。

Nucleic Acid Delivery to Induce the Secretion of Angiogenic Factors from Hepatocyte Sheets

Jun Kobayashi¹, Hyukjin Lee¹, Masayuki Yamato¹, Teruo Okano¹

¹Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University

²Collage of Pharmacy, Ewha Womans University

Tel: +81-3-3353-8112x43215, Fax: +81-3-3359-6046, E-mail: kobayashi.jun@twmu.ac.jp

N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子を用いた効率的な間葉系幹細胞単離技術の開発

¹九州大学先端物質化学研究所, ²ソマール株式会社, ³東京大学生産技術研究所

○伊勢 裕彦¹, 松永 久美子², 篠原 満利恵³, 酒井 康行³

【緒言】

現在、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSC)を用いた再生医療研究が盛んに行われており、ラット及びマウス、ヒトなどの骨髄組織や脂肪組織から単離された MSC が研究に用いられている。現在では、研究用の MSC はヒトを初め広く販売されているが、ロット差による分化能のばらつきが大きいことが知られている。このロット差は、MSC 樹立時の培養日数や継代回数に依存していると考えられる。骨髄細胞集団からの MSC の単離では、骨髄細胞を細胞培養用ディッシュに播種し、このディッシュに接着し増殖する細胞を MSC として単離している。これらの MSC の細胞培養用ディッシュに対する初期の接着は、非特異的な相互作用に依存しており効率的な接着が実現できていない可能性が考えられる。このため、十分な細胞数を得るための長期培養が必要となり、その培養条件によって品質が大きく左右されることが予想される。

本研究では、MSC に発現する細胞骨格分子ビメンチンに着目し、このビメンチンの発現を指標に効率的な MSC の単離を検討する。骨髄細胞集団中には、骨髄球、赤血球、赤芽球、好酸球、造血幹細胞、間質細胞 (MSC を含む) が存在している。これらの細胞種の中で、ビメンチンを発現する細胞は MSC を含む間質細胞であるため、ビメンチンを指標にすれば、効率的な MSC の濃縮が期待できる。我々は、これまでにビメンチンが細胞膜表面上に出現して N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 糖鎖高分子と結合することを報告してきた。そこで、この GlcNAc 糖鎖高分子をコーティングした細胞培養用ディッシュを作製し、骨髄細胞集団中の MSC が、これらのディッシュに選択的に接着し増殖するか検証し、MSC の効率的な単離の実現を検討した。

【実験】

アクリル酸を主鎖とする GlcNAc 糖鎖高分子 (AC-GlcNAc) を作製し、細胞培養用ディッシュにコーティングを行った。これらのコーティングについて、GlcNAc 特異的レクチンであるサクシニル化 WGA によって確認した。そして、AC-GlcNAc コーティングディッシュに対して不死化ヒト MSC を播種し、AC-GlcNAc を介した接着を確認した。次にラット骨髄細胞を AC-GlcNAc コーティングディッシュに播種し培養することで MSC のコロニー形成をクリスタルバイオレットで検討した。

【結果と考察】

AC-GlcNAc の細胞培養用ディッシュに対するコーティングを検討したところ、AC-GlcNAc が安定にコーティングされることが示された。また不死化ヒト MSC を用いて AC-GlcNAc コーティングディッシュへの接着を検討したところ、ビメンチンを siRNA でノックダウンした MSC の AC-GlcNAc への接着が低下したことから、MSC の細胞表面上のビメンチンを介した AC-GlcNAc の接着が示された。ラット骨髄細胞を AC-GlcNAc コーティングディッシュに播種し 17 日間培養したところ、通常の細胞培養用ディッシュでは、ディッシュ全体面積の 10% 程度のコロニー形成であったが、AC-GlcNAc では、30~40% 程度のコロニー形成率であった。また増殖した細胞は、CD106 及び CD90 陽性、CD11b 陰性であり、脂肪分化及び骨分化の検討では、Oil-red O 及び alizarin red 染色が観察され分化能が確認された。従って AC-GlcNAc コーティングディッシュ上のコロニーは MSC であることが確認された。以上のことから、AC-GlcNAc コーティングディッシュによる効率的な MSC の単離が期待された。

Development of effective isolation system for mesenchymal stem cells by using GlcNAc-bearing polymers

Hirohiko Ise¹, Kumiko Matsunaga², Marie Shinohara³, Yasuyuki Sakai³

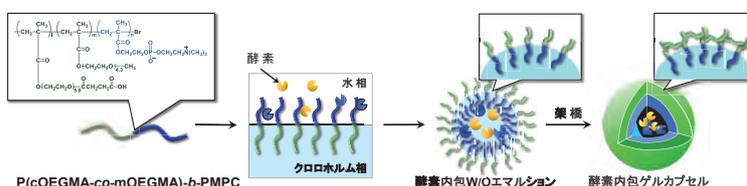
¹Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, ²Somar Corp., ³Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

Tel: +81-92-802-2503, Fax: +81-92-802-2509, E-mail: ise@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

診断応用への展開を志向した水溶性物質を内包可能なゲルカプセルの調製

¹ 関西大学化学生命工学部, ² 関西大学 ORDIST
 ○平林 利香¹, 河村 暁文^{1,2}, 宮田 隆志^{1,2}

【緒言】細胞内では酵素が高濃度に存在し、酵素反応の生成物が次の酵素反応へとドミノ型に進行する酵素カスケード反応が生じる。生物は、この酵素カスケード反応により高効率で代謝反応を進行させている。また、診断分野においても複数の連続した酵素反応が利用されている。しかし、効率よく反応を進行させるためには、高濃度の酵素を用いて複数の酵素を近接させる必要があり、多量の酵素を用いることが課題であった。そこで、われわれは内水相に水溶性物質を高効率で内包可能な Water-in-Oil (W/O) エマルジョンに着目した。本研究では、高効率で酵素を内包可能なゲルカプセルの調製を目的として、カルボキシ基を有する carboxy oligo(ethylene glycol) methacrylate (cOEGMA) と methoxy oligo(ethylene glycol) methacrylate (mOEGMA) との共重合体 (P(cOEGMA-co-mOEGMA)) と poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) とからなるブロック共重合体 P(cOEGMA-co-mOEGMA)-b-PMPC を合成し、W/O エマルジョンの形成について検討した。さらに、エマルジョン外層を架橋することにより、水相にも分散可能な酵素内包ゲルカプセルの調製を試みた (Scheme 1)。



Scheme 1. Schematic illustration for preparation of enzyme encapsulated gel capsules.

【実験】cOEGMA と mOEGMA, 2-hydroxyethyl 2-bromoisobutyrate, tris[2-(dimethyl amino)ethyl] amine および CuBr とを用い、単電子移動リビングラジカル重合により P(cOEGMA-co-mOEGMA) を合成した。続いて、重合終了後の先の反応系に MPC を加えて重合することにより、P(cOEGMA-co-mOEGMA)-b-PMPC を合成した。この P(cOEGMA-co-mOEGMA)-b-PMPC をリン酸生理食塩水 (PBS(-)) / クロロホルム混合溶媒中に添加して超音波照射し、エマルジョンを形成させた後、エマルジョン外層を 1,4-butanediamine で架橋してゲルカプセルを調製した。ゲルカプセルの粒径は、動的光散乱 (DLS) 法により求めた。

【結果と考察】得られた P(cOEGMA-co-mOEGMA)-b-PMPC は、PBS(-) / クロロホルム混合溶媒中で PMPC ブロックが水相に、P(cOEGMA-co-mOEGMA) ブロックがクロロホルム相に分配されることで乳化剤として作用し、粒径約 260 nm の W/O エマルジョンを形成することがわかった。次に、1,4-butanediamine を用いてエマルジョン外層のカルボキシ基を架橋した。反応後、連続相をクロロホルムから水に置換して DLS 測定を行ったところ、単峰性の粒径分布を有する約 260 nm のゲルカプセルが生成したことがわかった (Fig. 1)。したがって、PBS(-) / クロロホルム混合溶媒中において形成された W/O エマルジョンの界面を安定化している P(cOEGMA-co-mOEGMA)-b-PMPC のカルボキシ基間をジアミンによって架橋することにより、P(cOEGMA-co-mOEGMA)-b-PMPC が溶解する水中においても安定に分散可能なゲルカプセルが得られることがわかった。

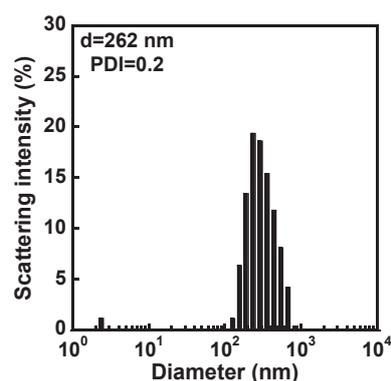


Fig. 1. Size distribution of gel capsules prepared by crosslinking of P(cOEGMA-co-mOEGMA)-b-PMPC emulsifier using 1,4-butanediamine.

Preparation of Gel Capsules That Act as an Enzymatic Cascade Reaction Field for Diagnostic Systems

Rika Hirabayashi¹, Akifumi Kawamura^{1,2}, Takashi Miyata^{1,2}

¹Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering and ²ORDIST, Kansai University
 Tel: +81-6-6368-1978, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: akifumi@kansai-u.ac.jp

におい分子の揮発を制御する多糖超薄膜の創製と機能評価

¹東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, ²東海大学工学部応用化学科, ³東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター

○土屋 笙子¹, 松本 拓也², 中川 篤³, 岡村 陽介¹⁻³

【緒言】近年、消臭・芳香機能を特徴にした化粧品が市場で多く出回っている。しかし、におい成分は高揮発性である他、汗などで有効成分が流れてしまうため効果の持続性が課題となっている。他方、我々は、高分子を薄膜状に加工した高分子超薄膜(ナノシート、膜厚 100 nm 以下)が、ナノ厚特有の高い接着性を発現し、物理吸着のみで様々な界面に貼付可能であることを見出している¹⁾。本研究では、生体適合性を有しアミノ基や水酸基を豊富にもつ多糖類の一つであるキトサンからなるナノシートに、におい分子を包接するためのシクロデキストリン(CD)を化学結合させた「貼る消臭剤・芳香剤」の創製することを目的とした。

【実験】セルロースアセテート溶液(CA, 40 mg/mL in 1,4-dioxane)を SiO₂ 基板(2×2 cm)上にスピコート法で成膜(4,000 rpm, 20 s)し、犠牲膜とした。次いで、キトサン溶液(CS, 10 mg/mL in 2% AcOHaq.)を同じくスピコート法で成膜(6,000 rpm, 60 s)し、CS ナノシートを調製した。Methylene diphenyl diisocyanate(MDI)とβ-CD あるいはγ-CD 混合溶液(15 mM, 3.8 mM in DMF, 0.5 mL)に、触媒として triethyl amine(2.5 mM)を添加し、CS ナノシート上にキャスト後、加熱(70°C, 1 h)した。DMF にて洗浄後、アセトン中で犠牲膜である CA 層を溶解させ、CD 担持 CS ナノシート(CD-CS ナノシート)を得た。

調製した CD-CS ナノシートをにおい分子である Linalool(0.2 mL)と共に密閉ビン(容量 350 mL)中に入れ、静置した(r. t., 15 h)。その後、ナノシート上に吸着した Linalool を Acetone(1 mL)で溶解・回収し、ガスクロマトグラフィー分析に供し、Linalool 吸着量を定量した。また、ポリエチレン基板(PE, φ10 mm)上に貼付した CD-CS ナノシート上に Linalool 溶液(30% in Ethanol)を 10 μL 滴下後、気体捕集ポンプを用いて経時的に揮発した Linalool を回収し、揮発挙動を解析した。

【結果と考察】CA 犠牲層の上に CS 溶液を成膜し、MDI を介して CD を反応させた。アセトン中で CA 層を溶解・除去したところ、SiO₂ 基板の形状を維持したままナノシートを回収することに成功した。皮膚に貼付することも可能であり、目立たず装着感すらないことも特筆すべき点であった。CD-CS ナノシート単位面積当たりの Linalool 吸着量は、CD 未担持体の 4 倍以上と高値を示しており、ナノシート上に表面修飾された CD によって Linalool が包接されたことを示唆した。そこで、皮膚貼付を想定してナノシートを基板上に貼付し、30% Linalool 溶液を滴下したあとの気相中の Linalool 濃度を経時的に定量した。その結果、MDI 架橋した CS ナノシートを貼付することにより、Linalool の揮発速度は低下した。また、CD を担持させることでその効果は顕著に発現し、長時間持続していた。以上より、架橋剤を介して CD を CS ナノシート上に表面修飾することにより、におい分子の揮発を抑制しつつ長時間芳香させる技術を確立した。

【参考文献】1) Y. Okamura *et al.* *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4388-4392.

Fabrication and evaluation of polysaccharide ultra-thin films for controlled release of odor molecules
Shoko Tsuchiya¹, Takuya Matsumoto², Atsushi Nakagawa³, Yosuke Okamura¹⁻³

¹Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University

²Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University

³Micro/Nano Technology Center, Tokai University

¹Tel: 0463-58-1211 (Ex.4692), FAX: 0463-50-2426, E-mail: aromarose.328@gmail.com, y.okamura@tokai-u.jp

pH Sensor via Tunable G-quadruplex Structure on Gold Nanoparticle Surface

¹Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, ²RIKEN Cluster for Pioneering Research
 ○Surachada Chuaychob^{1,2}, Masahiro Fujita², and Mizuo Maeda^{1,2}

【Introduction】

The hydrogen ion exponent, pH, has a vital role in human body that is strongly effect to cell ability. The pH is a scale from 0 to 14, with 7 being neutral. The human blood pH, however, varies in a very narrow range around 7.35~7.45. Below or above this range means symptoms and disease. If the blood pH moves to much below 6.8 or above 7.8, the cells stop functioning and the patient dies. So, a noninvasive pH screening of human fluid, especially blood, is necessary to be a clue for early stage of symptoms and disease diagnosis. In this study, we would like to develop a real-time pH sensor for an alternative non-invasive screening test using G-quadruplex DNA-conjugated gold nanoparticles for quantitative and qualitative analysis.

【Experiment】

G-quadruplex DNA (G4) was functionalized onto the surface of gold nanoparticle (AuNP). In this work, thrombin aptamer (TBA) is a candidate for G4 strand due to its pH-sensitive property. Before the immobilization of TBA on AuNPs (TBA-AuNPs), TBA was modified with linker bases and connected to poly-adenine (polyA) as a pH sensor. Then the concentration and length of complementary strand, the length of linker between poly-A and TBA, reaction time, and salt (NaNO₃) concentration were optimized. The degree of particle aggregation was monitored using the ratio between the absorbances at 590 nm (aggregated particles) and at 529 nm (dispersed particles). The higher ratio thus indicates the higher degree of aggregation.

【Results and Discussion】

In acidic conditions, TBA-AuNPs were dispersed (red color solution) even if the complementary strands of TBA (cTBA) was added. On the other hand, a non-crosslinking aggregation of TBA-AuNPs in basic solution (the purple-blue solution) occurred. This is due to the difference of DNA structure. As shown in Fig. 1, the formation of rigid duplex by inter-strand hybridization with cTBA, leading to the non-crosslinking aggregation, while a loose loop structure because of the intra-strand hybridization of DNA was formed in acidic conditions.

After optimizing some parameters i.e. a number of linker bases, salt (NaNO₃) concentration, and reaction time, the degree of aggregation was significantly different between acidic and basic solutions with 1.0 OD of TBA-AuNPs in 0.1 M Na⁺ phosphate buffer containing 0.25 M NaNO₃ within 10 minutes. Obviously, the solution color changes easily from red to blue with number of linker more than 2, 3 and 4 bases (i.e. TC, TTC, TCTC). The more basic solution the larger degree of colorimetric change was shown. Then the length and concentration of complementary strands would have evaluated further and it is expected pH-dependent aggregation would be drastically increased due to the huge change in DNA rigidity from G4 to duplex and the intrinsic hybridization affinity. TBA-AuNPs show a good feasibility and sensing property for pH detection based on a non-crosslinking behavior. Under an optimum condition, we expect that this sensor can possibly apply to use as a non-invasive tool for symptoms and diseases primary screening, i.e. blood pH test, in near future.

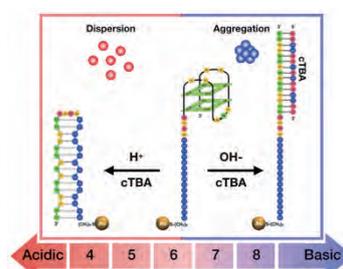


Figure 1. Schematic drawing of a modified TBA on AuNPs. At lower pH, the TBA is deformed to a loose loop structure. The particles remained dispersed, showing a red color solution. At higher pH, the TBA unfolds and then hybridizes with cTBA, leading to a rigid inter-strand duplex, providing an particle aggregation with purple-blue color solution.

pH Sensor via Tunable G-quadruplex Structure on Gold Nanoparticle Surface

Surachada Chuaychob^{1,2}, Masahiro Fujita², and Mizuo Maeda^{1,2}

¹Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo ²RIKEN Cluster for Pioneering Research
 Tel: +81-48-467-9312, Fax: +81-48-462-4658, E-mail: mfujita@riken.jp and mizuo@riken.jp

タンパク質高感度検出を可能とする分子インプリント蛍光ナノセンサ

¹神戸大学大学院工学研究科

○水川 裕貴¹, 堤 克輝¹, 北山 雄己哉¹, 竹内 俊文¹

【緒言】

特定のタンパク質を高感度かつ特異的に検出可能な材料は、疾患の早期発見や経過観察において重要な役割を果たすことから高い注目を集めている。分子インプリントポリマー (MIPs) は、標的分子に対する認識空間を高分子マトリクス中にもつ人工分子認識材料であり、近年では抗体に匹敵する感度と選択性で標的分子を認識することが可能となりつつある。そのような中、当研究室では生体内で生じるタンパク質の翻訳後修飾に倣い、分子インプリンティングによる認識空間を構築後、後天的に部位特異的修飾を施すポストインプリンティング修飾 (PIM) を独自に開発した¹⁾。その結果、MIPs への機能変換・機能付与を達成し、これまで様々な標的分子を高感度に検出可能な MIP 薄膜の構築に成功している。

本研究では、分子インプリンティングおよび PIM を用いた標的タンパク質を高感度かつ特異的に認識可能な分子インプリント蛍光ナノセンサの開発を試みた。モデル標的タンパク質として選択したヒト血清アルブミン (HSA) を用い、PIM 用鑄型タンパク質を設計・合成し、この鑄型タンパク質を用いた MIP ナノゲル (MIP-NGs) を合成した。さらに、得られた MIP-NGs に対して PIM により蛍光分子を導入することで、標的タンパク質の結合情報を蛍光挙動の変化として検出することが可能な MIP ナノセンサを構築した。

【実験】

ヒト血清アルブミン (HSA) に 2-iminothiolane(2-IT) を 4°C で 1 時間反応させてチオール基修飾 HSA を得た。さらに、チオール基修飾 HSA を methacryloyl ethyl pyridyldisulfide と反応させることで HSA にジスルフィド基を介してメタクリロイル基を修飾した。チオール基およびメタクリロイル基の導入数を、MALDI-TOF-MS を用いて定量した。メタクリロイル基修飾 HSA、pyrrolidyl acrylate (PyA)、*N*-isopropylacrylamide (NIPAm)、2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC)、*N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAA)、2-2'-azobis(2-methyl propionamide) dihydrochloride (V-50) を 10 mM phosphate buffered saline pH 7.4 (140 mM NaCl : PBS) 中で、70°C で 12 時間、無乳化剤沈殿重合を行うことで MIP-NGs を作製した。次に *N*-Hydroxysuccinimide 修飾を施したシリカ粒子で未反応のメタクリロイル基修飾 HSA および HSA を結合しているナノゲルを捕捉し、その他の未反応物や不純物を除去した。その後、tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride を添加してジスルフィド結合を切断し、HSA が除去された MIP-NGs のみを回収した。引き続き、HSA 認識空間内に残存するチオール基に蛍光レポーター分子を導入し、蛍光修飾 MIP-NGs を得た。この MIP-NGs に種々の濃度の HSA 溶液を添加し、そのときの蛍光強度を蛍光分光光度計により測定することで、HSA に対する結合挙動を評価した。

【結果と考察】

2-IT 反応後の HSA に導入されたチオール基の個数は約 9.0 個であり、その後 methacryloyl ethyl pyridyldisulfide を反応して導入されたメタクリロイル基の個数は約 8.5 個であったことから、メタクリロイル基修飾 HSA の合成を確認した。得られた MIP-NGs の DLS 測定結果より粒子径は 18 nm であった。蛍光レポーター分子を導入した MIP-NGs に対する HSA の結合挙動を蛍光強度変化により評価したところ、濃度依存的な蛍光強度変化が観察され、蛍光レポーター分子導入 MIP-NGs を用いて標的タンパク質の蛍光検出が可能であることを明らかにした。

(1) Horikawa R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 13023-13027 (2016)

Molecularly imprinted nanosensors for fluorescent detection of proteins

Yuki Mizukawa¹, Katsuki Tsutsumi¹, Yukiya Kitayama¹, Toshifumi Takeuchi¹

¹ Graduate School of Engineering, Kobe University

Tel: +81-78-803-6158, Fax: +81-78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

酵素ナノオブジェクトを用いた多機能薄膜の創製

慶應義塾大学大学院理工学研究科
○溝口 昂太郎・福井 有香・藤本 啓二

【緒言】生体内においていくつかのタンパク質は、分子間相互作用に基づく組織化によって、ユニークな高次構造と複合的機能を有する構造体を形成している。われわれは、これまでにウシ血清アルブミン(BSA)に機能性ポリマーをグラフト化し、それらの組織化をコントロールすることで、ナノスケールで構造と機能を調節したタンパク質構造体(タンパク質ナノオブジェクト)の構築を行ってきた。本研究では、BSAに加えて酵素の表面からポリマーグラフト化を行い、それらを組み合わせて、薄膜状のタンパク質ナノオブジェクトの創製と機能発現を目指した。

【実験】縮合剤のDMT-MMを用いてGlucose oxidase(GOD)のアミノ基に *N,N*-Diethyldithiocarbamide acetic acid (DCAA)を反応させて、iniferter 基の導入を行った(GOD-*i*)。次に、この GOD-*i* に両親媒性の *N,N*-Dimethylacrylamide (DMAA)を加え、5°CにおいてUV照射(高圧水銀灯、365 nm)をすることでリビングラジカル重合を行った(GOD-D)。得られた GOD-D について、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による分子量測定と円偏光二色性測定(CD)によるタンパク質の二次構造変化の検討を行った。また、GOD-Dの酵素活性評価として、基質の β -D-Glucoseを加え、発生したH₂O₂を Peroxidase(POD)の活性から評価した。この際、基質として発色試薬(Phenol, 4-Aminoantipyrine)を加え、酸化縮合による吸光度(505 nm)の増加を検出した。続いて、撥水性を付与するために GOD-D から 2,2,2-Trifluoroethyl methacrylate(3FMA)のグラフト共重合(GOD-D-F)を行い、X線光電子分光法(XPS)による元素分析を行った。同様に BSA を用いて BSA-D と BSA-D-F の作製を行った。次に、減圧乾燥などによって種々の基板にグラフト化タンパク質のコーティングを行い、薄膜の形成と剥離を試みた。作製した薄膜について、接触角測定、走査型電子顕微鏡(SEM)による形状観察、耐水性の確認および酵素活性評価を行った。

【結果と考察】GPC測定より、UV照射時間とともにBSA-DとGOD-Dの分子量が増大することがわかった。また、CD測定より、DMAAポリマーをグラフト化してもタンパク質の二次構造はほとんど変化しないことがわかった。さらに、GOD-Dの酵素活性において最大速度 *V* の低下がみられたが、3時間後には未修飾のGODと同等の発色を示した。グラフト化ポリマーによって基質の拡散が阻害されたことによると考えている。グラフト化によって、水だけでなくメタノールにも溶解するようになり、DMAAポリマー由来の両親媒性を示すことがわかった。次に、これらグラフト化タンパク質をメタノール水溶液に溶解して、3FMAのグラフト共重合を行ったところ、XPSによる分析からフッ素原子が検出された。次に、ポリプロピレン基板へのコーティングを行ったところ、GOD-D-Fでは薄膜を形成することがわかった。この薄膜の接触角は104°となり、3FMAポリマー由来の撥水性を示した。おそらく、3FMAポリマー鎖間の疎水性相互作用によってタンパク質間およびタンパク質-基板間が強固に結合したためだと考えている。次に、BSA-D-FとGOD-D-Fの水溶液をナスフラスコ内で減圧乾燥することで薄膜を形成した。その後、水中に浸漬したところ膜は自発的に剥離し、膜厚約2.0 μ mの薄膜が得られた。GOD-D-F膜の剥離面の接触角は92°であり、平滑な表面であった。この膜上に β -D-Glucoseと発色試薬を滴下したところ、Glucose濃度に依存した発色が観察され、酵素活性を有する撥水性の薄膜を作製することができた(Fig. 1)。

Fig. 1
Detection of
glucose by a
sheet of
GOD-D-F.



Glucose /mg dL ⁻¹	12.5	25.0	50.0	125	250
Absorbance	0.051	0.070	0.262	0.594	0.730

Fabrication of multi-functional thin films assembled from enzyme nano-objects

Kotaro MIZOGUCHI, Yuuka FUKUI and Keiji FUJIMOTO

Graduate School of Science and Technology, Keio University

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

表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた microRNA の複数同時検出

¹東理大基礎工,²順天堂大医,³東理大基礎工教養,⁴理研前田バイオ
○喜種椋一¹, 石原量², 秋山好嗣³, 猪股祥子¹, 細川和生⁴, 前田瑞夫⁴, 菊池明彦¹

【緒言】 がんは、日本人の2人に1人が生涯の内一度は罹患するといわれている病気である。がんに罹患すると、血中循環 microRNA (miRNA) の濃度が変化する^[1]。濃度変化する miRNA の種類は、がんの病種と病期によって異なるため、複数の miRNA の同時検出はがん検査において非常に重要である^[2]。また、がん検査は、時間と費用がかかるため、短時間かつ低コストで診断可能なデバイスが求められている。そこで本研究では、poly(dimethylsiloxane) (PDMS)製のマイクロ流路を有するマイクロチップに着目した。このマイクロチップは、低コストで簡便に作製でき、流路表面に高分子鎖を修飾することで、miRNA^[3]や細胞外ベシクル^[4]などの、がんのバイオマーカーを短時間かつ簡便に検出できる。これまでの研究^[3]では、マイクロチップの1つの流路に対して1種類の miRNA しか検出できなかったが、本研究では1つの流路に対し2種類の蛍光を用いて、肝臓、および前立腺がんのバイオマーカーである miR-500a-3p^[5]、および miR-16^[6]の2つの miRNA の同時検出を目的とした。

【実験】 電子線グラフト重合法によって、poly(glycidyl methacrylate)鎖を修飾したマイクロチップの流路を、捕捉用プローブ DNA 混合液 (50 μmol/L, CP16, CP500)で満たし、37°Cで2時間静置して流路表面に CP DNA を固定した。また、CP DNA が1つの流路に2種類固定されていることを確認するために、二つの異なる色で蛍光標識された CP DNA を固定したチップを作製し、固定量を定量した。その後1時間以上脱気し、表面機能化自律駆動 (SF-PF)マイクロチップを得た。miRNA の検出は、検出用の蛍光標識プローブ DNAs (DP16-Flu, DP500-TMR)と miRNA をチューブ内で5分間静置することで相補鎖を形成させ、流路内をブロッキング後、この溶液を5分間チップに通液し、最後に流路を7分間洗浄した後、蛍光強度を測定し評価した。

【結果と考察】 蛍光標識 CP DNA によって、1つの流路に2つの CP DNA がほぼ同量固定できていることを確認した。SF-PF microchip を用いて miRNA を検出した結果を Fig. 1 に示す。2種類同時および単独の miRNA 検出において、標的 miRNA と control シグナルの間に *t* 検定による 5% 水準で有意差があった。また、単独の miRNA の検出において、流路に導入していない miRNA のシグナルは control と同程度であった。

以上のことから、SF-PF マイクロチップに2種類の CP DNA を固定することで、2種類の蛍光を利用して標的 miRNA を選択的かつ複数同時に検出できることが実証できた。今後、本研究で作製した SF-PF マイクロチップのがん検査への貢献が期待できる。

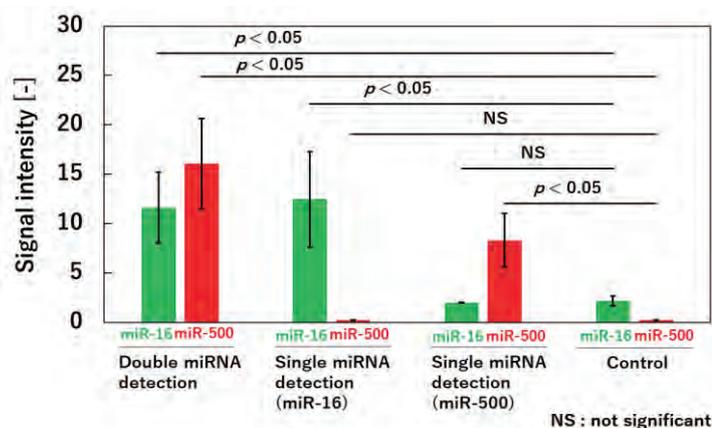


Fig. 1 Duplex detection of miRNA on the SF-PF microchip (n=3, mean ± SD.)

【参考文献】 [1] P. Mitchell *et al.*, *PNAS*, **2008**, 105, 10513-10518. [2] M. Tsujiura *et al.*, *Br. J. Cancer*, **2010**, 102, 1174-1179. [3] R. Ishihara *et al.*, *Anal. Sci.*, **2017**, 33, 197-202. [4] R. Ishihara *et al.*, *ACS Omega*, **2017**, 2, 6703-6707. [5] Y. Yamamoto *et al.*, *Biomarkers*, **2009**, 14, 529-538. [6] A. Schaefer *et al.*, *Int. J. Cancer*, **2009**, 126, 1166-1176.

Multiplex Detection of MicroRNAs on the Surface-Functionalized Power-Free Microchip

Ryoichi Kitane¹, Ryo Ishihara², Yoshitsugu Akiyama³, Shoko Inomata¹, Kazuo Hosokawa⁴, Mizuo Maeda⁴, Akihiko Kikuchi¹ ¹Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci. (6-3-1 Nijjuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan), ²Fac. Med., Juntendo Univ. (1-1 Hirakagakuendai, Inzai, Chiba, 270-1695, Japan), ³Fac. of Ind. Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Sci., (102-1 Tomino, Oshamambe-cho, Yamakoshi-gun, Hokkaido 049-3514, Japan), ⁴Bioeng. Lab., RIKEN (Wako, Saitama 351-0198, Japan)

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

高選択・高感度センシングを指向したハイドロゲル支持プラズモニクセンサの開発

¹大阪府立大学大学院 工学研究科, ²JST さきがけ
○山田 大空¹, 川崎 大輝¹, 井上 千種¹, 前野 権一¹,
末吉 健志¹, 久本 秀明¹, 遠藤 達郎^{1,2}

【緒言】 金属ナノ構造は、その表面において自由電子の集団振動と光電場振動の共鳴(局在表面プラズモン共鳴: Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)に起因する特定波長光吸収・増強電場形成を示す。LSPR の共鳴波長は周辺の屈折率によって変化するため、金属ナノ構造を周期的に配列したプラズモニク結晶(Plasmonic Crystal: PC)は、ナノ構造近傍での生体分子の結合・解離に起因した屈折率変化を検出する非標識センサとしての応用が進められている。LSPR 波長の変化は電場発生領域での屈折率変化により生じるため、PC センサの感度向上には測定対象物質を電場発生領域に効率よく導入する手法が必要である。

一方我々は最近、ナノ構造転写技術であるナノインプリントリソグラフィ(Nanoimprint Lithography: NIL)を用いた大面積・簡便なPC作製に成功した。NILでは、様々なポリマー材料を支持基材に利用できるため、蛍光色素・分子認識分子等、高機能分子の支持基材内導入によって、PCの高機能化が期待できる。そこで本研究では、ハイドロゲルを支持基材としたPCを着想した。ハイドロゲル支持PCは、ゲル内に電場発生領域と分子認識分子(抗体・一本鎖DNA等)を導入でき、ゲル網目の分子ふるい効果による妨害物質の除去も期待できる。今回は、PCの試作、ゲル特性・光学特性の評価から、コンセプトの確認を行ったので報告する。

【実験】 Au厚さ100 nmのPCを、NILプロセスで作製した。支持基材のハイドロゲルとしてpoly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA)、認識素子固定化に用いるカルボキシ基導入用のAcrylic acid (AAc)をPEGDA+AAc=99 v/v%となるよう調製し、重合開始剤の2-Hydroxy-2-methyl propiophenone (HOMPP)を1 v/v%添加して光重合を行った。今回はAAc濃度を0, 20, 40 v/v%としてPCを作製した。

ゲル特性評価では、タンパク質浸透能調査を行った。ここでは、2 mm四方の四角型流路内にゲルプレポリマー溶液を導入、重合させた後、50 μ g/ml Anti-mouse IgG-TRITC (in 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4)を導入して5, 30 min経過後の蛍光強度を測定した。

一方、光学特性評価では、ハイドロゲル支持PC内外のバルク屈折率応答を評価した。ここでは、乾燥・水中条件下でのPCによる反射吸収スペクトルを測定した。

【結果と考察】 NILで作製したPCの形状を走査型電子顕微鏡により観察した結果、PC構造が確認できた。ゲル特性評価では、AAc濃度が20, 40 v/v%の条件でタンパク質の浸透が確認され、一方で0 v/v%の条件ではタンパク質の浸透が見られなかったことから、ゲル濃度の検討による分子ふるい能調節の可能性が示唆された。

一方、光学特性評価においては、波長510 nm, 660 nm近傍に2つの吸収ピークが確認できた。電磁場解析によるピークの帰属から、各ピークはそれぞれゲル外部、ゲル内部の電場発生に寄与するLSPR由来の吸収であると考えている。水を加えた際の吸収ピークシフトからは、ゲル内部の電場発生に寄与するピーク(660 nm)のシフト量が外部のもの(510 nm)のおよそ2倍であった。このことは、ゲル内部での分子測定の優位性を示していると考えている。

Development of hydrogel supported plasmonic sensor for highly selective and sensitive detection

Hirota Yamada¹, Daiki Kawasaki¹, Chigusa Inoue¹, Kenichi Maeno¹,

Kenji Sueyoshi¹, Hideaki Hisamoto¹, Tatsuro Endo^{1,2}

¹Graduated School of Engineering, Osaka Prefecture University ²JST PRESTO

Tel: +81-72-254-8550, Fax: +81-72-254-9284, E-mail: spb02146@edu.osakafu-u.ac.jp

血中循環腫瘍細胞を高感度検出するためのフィルターの開発

富山県産業技術研究開発センター ものづくり研究開発センター
○寺田 堂彦, 大永 崇

【緒言】血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells, CTC) とは、癌組織から漏れ出して末梢血中を循環している腫瘍細胞である。血液 1 mL 中に血液細胞が 10^9 個存在するのに対し、CTC は数～十数個程度しか存在しない。しかし、それらは癌の転移、拡大において重要な役割を担っているといわれている。また、直径 5 mm 以下の初期癌からも CTC は発生するといわれているため、血液中から CTC を高感度で検出することが可能となれば、採血により癌を早期に発見できるため、画期的な診断ツールとなり得ると期待されている。しかしながら、現行で主流の抗上皮細胞接着分子 (EpCAM) 抗体をマイクロ流路等と組み合わせた捕捉システムでは、EpCAM 発現の低い CTC の捕捉確率は極端に低下してしまう。そこで、本研究では、ナノマテリアルの材料特性 (極低流体抵抗や比表面積など) を利用することにより、抗原抗体反応を最大効率化し、表面抗原の発現量の多寡に関わらず、CTC を高感度検出するためのフィルターの開発を目的とした。

【実験】所定量のキトサン ($M_v = 4.8 \times 10^5$) とポリエチレンオキッド ($M_v = 4.0 \times 10^6$) を 90% 酢酸水溶液に溶解したものをエレクトロスピニング法により紡糸した。得られた繊維試料を中和、水洗した後、各実験に供した。末端にビオチンおよび N ヒドロキシスクシンイミドエステルを有するポリエチレングリコール (b-PEG、 $M_n = 3000$) を繊維表面に修飾した後、未反応アミノ基にメトキシ末端 PEG (m-PEG、 $M_n = 2000$) を修飾した (Fig.1)。b-PEG 末端のビオチンにアビジンを介してビオチン化抗 EpCAM 抗体を固定した。高 EpCAM 発現 CTC、低 EpCAM 発現 CTC それぞれのモデル細胞として、ヒト食道癌由来細胞 (KYSE220)、ヒト乳癌由来細胞 (MDA-MB-231) を用いて実験を行った。

【結果と考察】エレクトロスピニング法により、比較的均質な繊維 (平均径 127 nm、 $SD=18$ 、 $n=40$) が得られていることを確認した。また、エタノール液面をコレクターとして繊維を捕集することにより、疎な繊維集合体を得られることを確認した (Fig.2)。分子鎖に沿って無数のアミノ基を有するキトサンは、細胞接着性を呈する材料として知られている。また、ECM を構成する線維と近いスケールを有する材料は、一般的に細胞接着性が向上するため、今回得られている繊維には、標的とする細胞以外の非特異接着が生じると予想される。実際に、MDA-MB-231 は、カバーガラス表面に疎な状態で紡糸された未修飾繊維に対して、スピコートフィルムや TCPS に対してよりも短時間で接着する様子が確認された。そこで、白血球等の非標的細胞の接着を抑制するために、m-PEG 修飾を行ったところ、未修飾繊維の場合で認められた細胞-材料相互作用による非特異的な細胞接着を抑制できた。一方、b-PEG と m-PEG とを複合修飾し、b-PEG 末端に抗 EpCAM 抗体を固定した繊維上では、播種直後に抗原抗体反応に起因すると思われる接着が生じ、緩やかな PBS 洗浄処理を行った後にも、ある程度の細胞数が保持される様子が確認された。標的とする特定の細胞とのみ、効率的に抗体抗原反応を高めるフィルター素材となりうると考えられる。

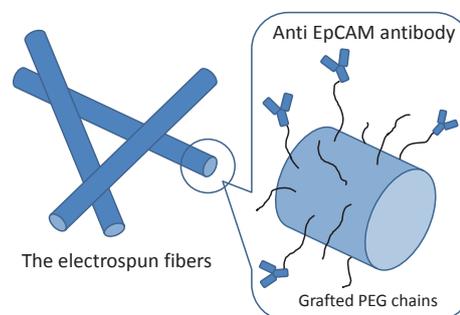


Figure 1 Schematic diagram of the surface-functionalized electrospun-fibers.

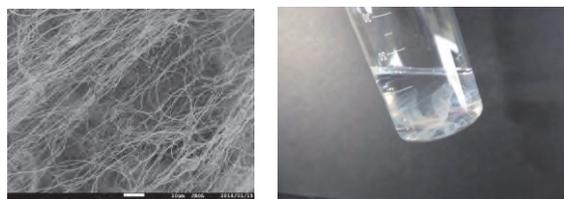


Figure 2 SEM image of the electrospun fibers (left) and photo of the spongy fiber (right).

Development of the Filter System Detecting Circulating Tumor Cells

Dohiko Terada, Takashi Ohnaga

MONOZUKURI R&D Center, Toyama Industrial Technology R&D Center

Tel: +81-766-21-2121, Fax: +81-766-21-2402, E-mail: terada@itc.pref.toyama.jp

ポリドーパミン層を基材とした細孔表面の簡便な表面機能化

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
○堀口 諭吉¹, 合田 達郎¹, 宮原 裕二¹

【緒言】コールターカウンターとして知られる細孔電気抵抗法（RPS）は、細孔を通過する粒子をイオン電流値の変化から読み取る分析装置で、血球や細菌、細胞などの計数に用いられている。近年では細孔形成技術の革新により、ナノオーダーの微細な細孔を用いてタンパク、ウイルス、細胞外小胞等の計測が報告されている。RPS では、検体が通過する際のイオン排除を電流値としてリアルタイムでモニタリングするため、検体の大きさや、形状、ゼータ電位などの評価が可能である。一方で得られる計測データは物理的な情報に限られ、検体の生物学的な特異検出を行う場合、分子修飾を施した人工界面を細孔に適用する必要がある。表面修飾プロセスは細孔の材料に依って制約を受けるほか、高コスト化にも繋がるため、これを解決する手法が求められる。そこで、本研究ではシンプルかつ容易なポリドーパミンを介した表面の機能化について着目した。ポリドーパミンはムール貝が岩などに接着する際に用いられる材料で、貴金属を始め、金属酸化物、半導体、セラミック、ポリマーなど多くの表面に接着が可能な分子である¹⁾。形成されたポリドーパミン層はアミノ基やチオール基を介した分子修飾が容易であるため、幅広く応用が可能な手法と考えられる。本研究ではポリドーパミン層を介した修飾法がサブマイクロオーダーの非常に小さな細孔を機能化する上でも有効な手法であることを示すため、分子修飾を実施し、細孔の分子層形成について電流値特性により評価した。

【実験】粒度分布・粒径測定ナノ粒子マルチアナライザー「qNano」に使用するポリウレタン製ポア、NP100をドーパミン液中（2 mg/mL）に浸漬させ、振盪機上でポリドーパミン層形成を行った。その後アニオン性チオール分子である 11-メルカプトウンデカン酸液中に浸漬し、ポリドーパミン層上にチオール分子層を形成させた。得られた分子修飾ポアについて qNano を用いて I-V 特性を計測した。

【結果と考察】分子修飾後、細孔を流れるイオン電流の I-V 特性について評価したところ、修飾前には見られなかった pH 依存的な I-V 特性が確認された (Figure 1)。これは 11-メルカプトウンデカン酸が表面に修飾されたことで、アルカリ性条件下において表面がアニオン化するためである。pH 4 においては I-V 特性に大きな屈曲は見られないが、pH 10 では表面のアニオン化によりイオンの移動に制約が生じた結果、整流効果が出現したと考えられる。以上から本手法が簡便な細孔の機能化手法として有効であることが示された。任意の分子をポリドーパミン層に固定化することで目的に応じた自由な細孔の表面修飾が可能であり、非常に汎用性が高い手法となりうる。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議が主導する革新的研究開発推進プログラム（ImPACT）の一環として実施したものです。

【参考文献】

1) H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, and P. B. Messersmith, Science 318,426 (2007).

Easy functionalization technique for a small pore with a polydopamine layer

Yukichi Horiguchi¹, Tatsuro Goda¹, Yuji Miyahara¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

Tel: +81-3-5280-8097, Fax: +81-3-5280-8135, E-mail: horiguchi.bsr@tmd.ac.jp

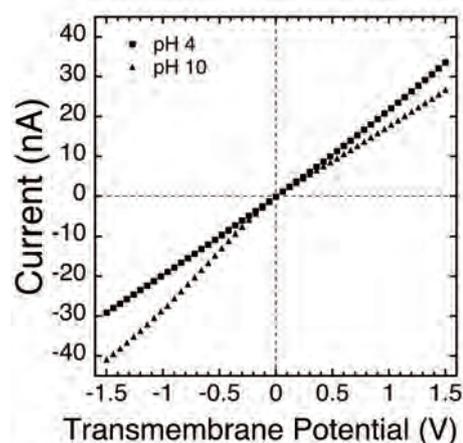


Figure 1 I-V measurement curves of pore (NP100) in different pH after the immobilization of polydopamine and 11-mercaptoundecanoic acid (MUA).

アクリルアミド-アクリル酸共重合体ゲルを用いた組織透明化と蛍光イメージング

大阪府立大学大学院工学研究科 物質・化学系専攻 応用化学分野
○大野優太, 児島千恵, 松本章一

【緒言】

蛍光イメージングは、生命現象の解明や病気の診断に有用であり、三次元的な蛍光イメージングのための組織の透明化技術がおおいに注目されている。近年、Chung らは組織透明化手法である CLARITY 法を開発した。CLARITY 法では、①マウス組織をアクリルアミド(AAm)ゲルに包埋した後に、②脂質を除去し、③媒体の屈折率を調節することで透明化している^{1,2)}。多くの場合、組織透明化は脳や胚などで実施されており、ゲル化試薬は灌流固定時にモデル動物に投与されている。透明化技術の用途展開を考えると、様々な臓器を摘出後に透明化することが望まれる。我々は、これまでに、アニオン性のスチレンスルホン酸ナトリウム(SS)と AAm と *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(bisAA)を共重合したアニオン性ゲルを用いることによって、摘出した組織の透明化を迅速に行えることを示してきた。これは、アニオン性ゲルでは負電荷の反発によって膨潤し、脂質の透過性が向上したためと考えられる³⁾。しかし、緑色蛍光蛋白質(GFP)を発現した組織をこの手法で透明化し蛍光イメージングを行ったところ、蛍光強度が減弱してしまった。そこで、本研究では、アクリル酸(AcA)と AAm の共重合体ゲルを用いて透明化を行った。種々の臓器由来の組織の透明化処理を行い、透明化に挙動を比較した。そして、GFP を発現した組織や蛍光剤で染色した組織の蛍光イメージングを行った。

【実験】

種々の臓器(脳、腫瘍、心臓、肺、胃、すい臓、脾臓、腎臓、十二指腸、盲腸)の組織切片(3×2×0.7 mm)に、AAm/AcA=25/75 の仕込み組成のモノマー、さらに bisAA、VA-044 およびパラホルムアルデヒドを浸透させた後、37 °C で 24 時間重合し、組織包埋ゲルを作製した。余分なゲルを除いた組織片を、4%ラウリル硫酸ナトリウムを含むホウ酸バッファーで所定期間振とうし、脂質の除去を行った後、エチレングリコールに浸した。各過程の組織の透明性評価を評価するとともに、透明化処理後の組織の蛍光観察を行った。

【結果と考察】

種々の臓器の透明化において、脳、肺と胃は脂質除去 3 日目で高い透明性が得られた。一方、脾臓、腎臓、膵臓、心臓は除去 3 日目において不透明であったが、除去 11 日目においてより透明性が向上した。しかし、盲腸は 11 日後でも透明化できなかった。したがって、臓器の種類によって透明化にかかる時間が異なることがわかった。

様々なゲルを用いて透明化処理した GFP を発現したマウスの脳組織の蛍光観察を行った。SS の場合とは異なり、AcA では AAm のみの場合と同程度の高い蛍光が観察された(図 1)。これより、AcA 共重合体ゲルを用いると、蛋白質を変性させることなく、迅速に透明化することがわかった。

【謝辞】マウスの様々な臓器、GFP を発現したマウスの脳組織は大阪府立大学大学院生命環境科学科の乾隆教授、東京大学大学院工学研究科の小野寺宏教授よりそれぞれご提供いただいた。

【参考文献】

[1] Chung, K. *et al.* Nature, 497, 332 (2013). [2] Tomer, R. *et al.* Nature Protocols, 9, 1689 (2014). [3] Ohno, Y., Matsumoto, A., and Kojima, C. revised.

Optical Tissue Clearing Using Acrylamide/Acrylic Acid Copolymer Hydrogels and Their Application to Fluorescence Imaging

Ohno Yuuta, Chie Kojima and Akikazu Matsumoto

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai 599-8531, Japan, Tel/Fax: +81-72-254-9292/+81-72-254-8190, e-mail: matsumoto@chem.osakafu-u.ac.jp / kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

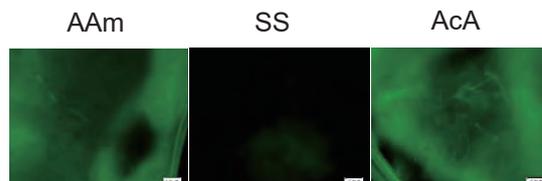


Figure 1. Fluorescence imaging of GFP-expressing mouse's brain after optical tissue clearing using various hydrogels.

がんの治療と診断を目的とした機能性高分子材料の開発

¹慶應義塾大学 理工学部, ²神戸薬科大学

○澤田 和紀¹, 甘中 健登², 佐野 紘平², 向 高弘², チッテリオ ダニエル¹, 蛭田 勇樹¹

【緒言】薬物を必要な場所へ届ける DDS によって、正常細胞に対する副作用を抑えるとともに、薬物分布を制御し、薬の投与量を減らすことができる。これを可能にする試みとして、高分子ミセルなどが、がん部位に蓄積する Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果を利用したものが多数報告されているが、この効果のみによるがん部位への特異性には限界がある。そこで本研究では、がん部位への特異性を向上させるため、EPR 効果に加え、pH 応答性や温度応答性などの機能性を持つ高分子材料の開発を行った。まず、がん部位周辺では pH の範囲が 6.5-6.8、エンドサイトーシス後に輸送される酸性オルガネラでは 5.0-6.0 と正常組織、血液中と比べて pH が低下していることに着目し、EPR 効果によってがん部位に蓄積した高分子ミセルが、がん部位の弱酸性 pH に応答して崩壊し、内包した Indocyanine green (ICG) を放出する pH 応答性高分子ミセルの開発を行った。さらに、温熱療法と組み合わせることを目的とし、末端にラジオアイソトープや蛍光プローブなどの機能性を導入することができるアミノ基を末端に持つ温度応答性高分子、腫瘍部位への集積性を高めることを目的とした、親水機能性高分子キャリアの開発を行った。

【実験】がん細胞周辺と酸性オルガネラの二つの弱酸性環境 pH をターゲットとして、それぞれの pH に応答するブロックと親水ブロックを持つ二種類の両親媒性ブロック高分子を合成した (Fig. 1)。その後、この高分子を用いてミセルを形成しつつ、ICG を内包した。そして、pH 5.6-7.4 の条件において、このミセルの流体力学的直径と蛍光スペクトルの測定を行った。また、異なる二種類のモノマーの比率を調整し、共重合させることによって、体温と外部加温により相転移を示す二種類の高分子を作製した (Fig. 2)。この高分子は、様々な機能性を導入可能なアミノ基を末端に持っている。さらに、この高分子を用いて、温度変化に対する流体力学的直径の変化と Lower Critical Solution Temperature (LCST) の測定を行った。加えて、高い血中滞留性を示しつつ、機能性を兼ね備えた親水性高分子キャリアの合成を行った。

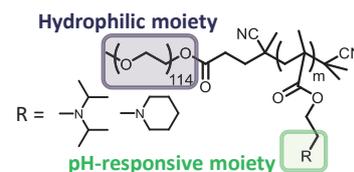


Fig. 1 両親媒性ブロック高分子

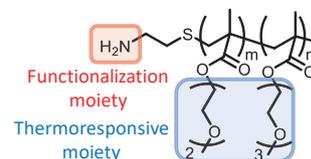


Fig. 2 温度応答性高分子

【結果と考察】

高分子ミセルにおいては、正常組織、血液の pH (pH 7.4) と比べ、低 pH ではミセルが崩壊していること、ミセル崩壊と濃度消光の解消による蛍光強度の増大を確認した。このメカニズムにより、ミセル投与後、血流中の pH では消光していた ICG が、がん部位においてのみ蛍光を発することで、ICG によるがん部位の選択的なイメージングが期待できる。さらに、この二種類の高分子ミセルを用いることで、ICG のがん部位での動態を明確にすること、pH 応答ブロックの pK_a を合成的アプローチにより変化させることで、患者によるがん部位での pH 環境の変化への対応といったオーダーメイド医療にも応用が可能になる。温度応答性高分子においては、約 30℃と 39℃を境にそれぞれ相転移が起きていることを確認した。これにより、腫瘍への直接注射によって体温に応答、あるいは温熱療法を組み合わせることで、静脈注射後に EPR 効果により腫瘍部位に集積し、高分子の相転移を経て、凝集を引き起こすことで、腫瘍部位での滞留性の向上が期待できる。

Development of functional polymer materials for cancer therapy and imaging

Kazuki Sawada¹, Kento Kannaka², Kohei Sano², Takahiro Mukai², Daniel Citterio¹, Yuki Hiruta¹

¹Faculty of Science and Technology, Keio University, ²Kobe Pharmaceutical University

Tel: +81-45-566-156, Fax: +81-45-566-1568, E-mail: hiruta@applc.keio.ac.jp

細胞標識を目指した蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドの合成

¹ 東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻² 関西大学化学生命工学部○大場倭利¹、最上譲二¹、森本展行¹、平野義明²、山本雅哉¹

【緒言】 蛍光を利用した細胞イメージングは、移植細胞の体内動態を評価する方法として注目されている。現在、細胞標識法として、蛍光色素を結合させたタンパク質や抗体の選択的結合や、蛍光色素と細胞内の特定部位との相互作用などが利用されている。しかし、細胞毒性や、蛍光色素が脱離するなどの問題が生じることがある。このため、低細胞毒性な方法により安定な細胞標識を実現する技術が望まれている。本研究では、細胞膜に貫通したタンパク質が安定に存在することに着目し、蛍光色素で標識することが可能であり、強固に細胞膜へ結合することができる蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドを合成した。すなわち、 α -ヘリックス型ペプチドとして知られる 6K ペプチドをベースに蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドを合成し、得られたペプチドを用いた細胞標識について評価した。

【実験】 Fmoc 固相合成法を用いて、RinkAmide AM resin (0.6mmol/g) から段階的にペプチドを伸長し、末端に親水的タグとしてリシン(K)を、中心部に疎水的 α -ヘリックスを形成する AAALAAAAALAAWAALAAA 配列をもった 6K ペプチドを合成した。これを比較対象とし、N 末端をアルギニン(R)化した 2R4K ペプチド、4R4K ペプチド、および 6R4K ペプチドを合成した。得られたペプチドに対して、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) により質量分析を行った。マトリックスとして CHCA を飽和状態まで溶かした溶媒(水:アセトニトリル:トリフルオロ酢酸=70:30:0.1)を用いた。合成ペプチドの二次構造を調べるために、塩化ナトリウム (10 mM) を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH7.0, 10mM) を溶媒としたサンプル溶液 (0.1mg/mL) に対して円偏光二色性(CD)スペクトルを測定した。さらに、蛍光色素 (FITC) を N 末端に対して修飾した蛍光標識ペプチドを、HeLa 細胞とともに 1 時間インキュベーション後、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて細胞を観察した。

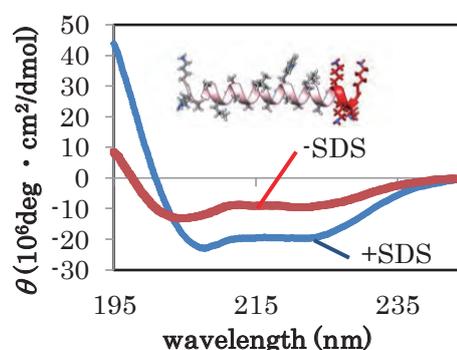


図1 6K ペプチドの CD スペクトル

【結果と考察】 MALDI-TOF-MS により、目的のペプチドの質量ピークが観測された (データ省略)。CD 測定の結果 222 nm に α -ヘリックス由来のピークが確認された (図 1)。細胞膜環境を模倣するために添加したドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の存在下では、 α -ヘリックスの形成が促進された。CLSM を用いた蛍光観察の結果、アルギニンが N 末端に修飾されたペプチドが細胞膜に結合することがわかった。一方、細胞内部への透過も認められたため、膜透過能が高すぎることを示唆された (図 2)。

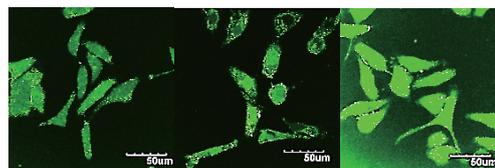


図2 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察(左から 2R4K, 4R4K, 6R4K)

Synthesis of cell-membrane-anchoring peptides for cell labeling

Wato Oba¹, George Mogami¹, Nobuyuki Morimoto¹, Yoshiaki Hirano², Masaya Yamamoto¹¹Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University²Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

Tel:+81-22-795-7313, Fax:+81-22-795-7313 E-mail:Wato.oba.p8@dc.tohoku.ac.jp

加速溶出試験を用いた金属イオン溶出・蓄積挙動の評価とアレルギー性の検討

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
○猪股泰将¹, 堤 祐介², 蘆田茉希², 陳 鵬², 土居 壽², 埴 隆夫²

【緒言】医療に用いられる材料は、人体機能の修復や再建に役立てられており、その中でも金属材料は優れた機械的性質を示すため、主に耐荷重が要求されるインプラントデバイスにおいて中心的な役割を果たしている。しかし、金属材料は腐食によって金属イオンを環境中に放出するため、使用の際にはその毒性による人体への影響を十分に考慮する必要がある。また、金属アレルギーは金属イオンが原因で発症に至るため、インプラントデバイスの腐食と金属のアレルギー性は密接な関係にあると考えられるが、この相関についての研究はほとんど報告がない。当研究グループでは生体環境中への金属イオンの放出と蓄積に着目し、腐食という観点から金属材料のアレルギー性の評価を試みてきた。本大会では、金属アレルギーの報告例が多いコバルト (Co)、ニッケル (Ni)、銅 (Cu)、パラジウム (Pd) や、医療用金属材料に多用されている一方、そのアレルギー性がほとんど解明されていないモリブデン (Mo) を対象に、加速溶出試験を用いた評価を実施し、そのアレルギー性の検討を行った。

【実験】試料には市販の純金属を用いた。試験溶液には pH 3.5 に調整した無機成分のみ的人工汗、その溶液にヒスチジン、パントテン酸、アスパラギン酸、尿素を添加した人工汗、pH 7.5 に調整したトリス塩酸緩衝液、その溶液に 10 vol% ウシ胎児血清を加えた溶液を調製して使用した。図 1 に加速溶出試験の概略図を示す。試験では、ガラスシャーレの底面に試料を貼り付け、ジルコニアボールを敷き詰めたフッ素樹脂容器に試験溶液とともに入れ、シェーカーで振とうさせた。試験溶液は、1、3、6、18、24、48 h 経過時に回収した。回収溶液は 1 vol% 硝酸水溶液で 10 倍に希釈して保存した。得られた溶液中に含まれる金属イオンの濃度を ICP-AES により測定した。溶液に着色が確認されるものについては、金属イオンの配位状態を分光光度計により評価した。

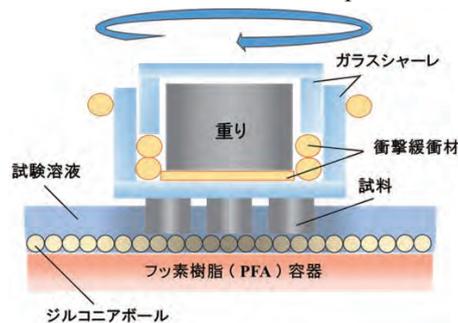


図1 加速溶出試験の概略図

【結果と考察】加速溶出試験から、各元素の金属イオンの蓄積挙動を評価が可能であった。Co、Ni、Cu、Pd は人工汗中において比較的高濃度の金属イオンの蓄積が確認され、特にタンパク質が存在する環境中において金属イオンの蓄積量が増大することが明らかとなった。一方、Mo はタンパク質の存在に関わらず、環境中へのイオン蓄積はほとんど生じなかった。これらの結果から、金属イオンと特定のタンパク質との結合が金属イオンの蓄積量にも影響し、アレルギー性の支配因子の一つとなっていることが示唆された。また、Mo はこれらの元素とは異なり、環境中への金属イオンの蓄積が起こりにくいことがわかった。さらに、不働態皮膜を生成する元素や合金は、たとえ不働態皮膜が破壊されるほどの摩耗を受けても、皮膜の修復過程において放出される金属イオンはごく微量であり、結果的に、金属イオンの環境中への蓄積が大幅に抑制されることが示唆された。本研究より、生体環境中への金属イオンの蓄積のしやすさと金属材料のアレルギー性には相関があることが明確に示された。

Investigation of relationship between metal-ion release and allergic property by accelerated dissolution test

Yasumasa INOMATA¹, Yusuke TSUTSUMI², Maki ASHIDA², Peng CHEN², Hisashi DOI², 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: ma170015@tmd.ac.jp

擬似体液中へのカルサイト浸漬によって誘起された石英ガラス基板におけるリン酸カルシウムの形成

¹立命館大学理工学研究科, ²立命館大学理工学部
○齋藤 祐幹¹, 平井 豪², 勝野 弘康², 中田 俊隆²

【緒言】

擬似体液（以下 SBF）を用いたバイオミネティック法によって、CaO-SiO₂-P₂O₅ などの多成分ガラス表面上にリン酸カルシウム化合物が形成されることは広く知られている。この際、ガラス表面からの Ca イオンの溶出及び、それに伴う Si-OH 基の生成がリン酸カルシウム化合物の形成機構において重要であると考えられている。しかしながら、この二つの現象は一つのガラス基板で同時に起こっているため、個々の影響を独立して制御し、評価した研究はほとんどない。そこで本研究では、基板として石英ガラスを、Ca イオン溶出源としてカルサイトを用いることで二つの現象を空間的に独立させ、これらを SBF に浸漬させた際のリン酸カルシウム化合物の形成過程を観察した。

【実験】

Ca イオンの溶出源として約 0.2g の天然カルサイト結晶 (CaCO₃, 菱形劈開 2 級, Mexico 産, ニチカ) を、基板として合成石英ガラス (SiO₂, Si₂ ≥ 99.99%, 11 mm×12 mm×1.0 mm, ケニス) を使用した。SiO₂ 基板のみ、もしくは SiO₂ 基板にカルサイトを載せたものをそれぞれ 28.6ml の SBF に 36.5°C で約 1~14 日間浸漬させた。基板表面に形成された析出物の形態および構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) や X 線回折装置 (XRD) を用いて評価した。またフーリエ変換型赤外分光光度計 (FT-IR) やエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX) を用いて、析出物の結合状態、組成分析を行った。

【結果と考察】

SBF に SiO₂ 基板のみを浸漬した場合、浸漬時間によらず基板表面に析出物は確認されなかった。一方で、カルサイトを SiO₂ 基板表面に載せた場合、浸漬させた約 1 日後からカルサイト近傍の SiO₂ 基板表面に数 μm 程度の球状析出物が形成した。この析出物には、EDX より Ca や P が含まれること、FTIR から PO 結合が存在することが確認された。また XRD パターンから浸漬直後においては、析出物是非晶質であり、浸漬時間の増加とともに結晶化することが示された。しかしながら、この結晶は、SBF に多成分ガラスを浸漬させた際に観察される骨類似アパタイトではなく、その前駆体であるリン酸水素カルシウム二水和物であることが明らかとなった。

The effect of calcite soaking in SBF on forming calcium phosphate on SiO₂ substrate

Hiroki Saito¹, Takeshi Hirai², Hiroyasu Katsuno², Toshitaka Nakada²

¹Department of Physical Sciences, College of Science and Engineering, Ritsumeikan University,

²Department of Physical Sciences, Ritsumeikan University

Tel: +81-77-561-3392, E-mail: rp0047hf@ed.ritsumei.ac.jp

段階的折り畳み様形状回復を実現する温度応答型生分解性形状記憶ポリマー材料の作製

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
 ○川岸弘毅¹, 能崎優太², 葛谷明紀^{1,3}, 大矢裕一^{1,3}

【緒言】

近年, 形状を変形・固定させた後, 温度変化にตอบสนองして元の形状へ回復する温度応答性形状記憶ポリマーの研究が行われている。形状記憶特性の発現には, 高分子鎖に元の形状(永久形状)を記憶するための架橋点と, 一時的な形状(一次記憶)へ固定する可逆的な固定相(結晶相)が必要であり, その結晶相が温度上昇に伴い融解することで, 一時的な形状から元の形状へ回復する。こうした形状記憶ポリマー

で生分解性を有するものは, 医療材料などへの応用が期待されている。しかし, 従来の形状記憶ポリマー作製方法で可能な形状には限界があり, 小さく折り畳んだ状態から広がる方向へ形状回復するフィルムの作製は容易であるが, その逆の広がった状態から折り畳まれた状態へ形状変化する立体構造物の作製は困難である。これは, 折り畳まれた状態の鋳型を作製することが難しいことが主要因である。

これまでに我々は, 鋭敏な温度応答性を示す生分解性形状記憶ポリマーとして分岐型ポリカプロラクトン(Branched PCL: br-PCL)架橋体を開発した¹⁾。今回, 架橋前の液状ポリマーを平面支持層全体の両側に塗布し, 目的の形状へ折り畳んだ後に架橋することで, 鋳型を用いることなく, 複雑な形状を永久形状とした形状記憶材料の開発に成功した(Fig. 1)。この手法を用いれば, 折り紙細工のように複数回折り畳んだ複雑な形状へと回復する材料の作製が可能となる。本発表では, br-PCL フィルムを折り畳むことで作製した形状記憶材料の形状回復能について, 定量的評価を試みた結果を報告する。

【実験・結果・考察】

平均 8 個の水酸基を有する polyglycerine の水酸基を開始点とした ϵ -caprolactone (CL) のバルク開環重合により, 1 本あたりの重合度(DP)=19, 26 の br-PCL を合成した。得られた br-PCL を加熱溶解し, Hexamethylenediisocyanate (HMDI) と混合後, 架橋反応させることにより, 正方形型の br-PCL フィルム(支持層)を作製した。そして, DP=19, 26 の br-PCL を支持層の異なる折り目部分に対して形状回復層として幅約 2cm で塗布し, 4 つ折りにしてから加熱して架橋反応を行うことで, 3 層構造を有する形状記憶フィルムを得た。DP=26 の br-PCL は, DP=19 の br-PCL と比較して約 10°C 形状回復温度が高いことを利用して, 折り目ごとに異なるポリマーを塗布して折り畳み順序を制御した。その結果, 温度上昇に伴って意図した通りの順序で, 段階的に 2 回折り畳まれた構造の元の形状に回復する形状記憶フィルムを作製が可能であった。さらに, 広がった状態(一時形状)の正方形の四隅の点間の距離が折りたたまれることによりどれだけ近接したかを測定することにより, 形状回復能を定量的に評価した。

【参考文献】

1) K. Nagahama, Y. Ohya *et al.*, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 1789–1794.

Preparation of temperature-responsive biodegradable shape memory polymer materials realizing stepwise multiple shape-recovery to folded states

Kouki KAWAGISHI¹, Yuta YOSHIZAKI², Akinori KUZUYA^{1,3}, Yuichi OHYA^{1,3} (1Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, ² ORDIST, 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

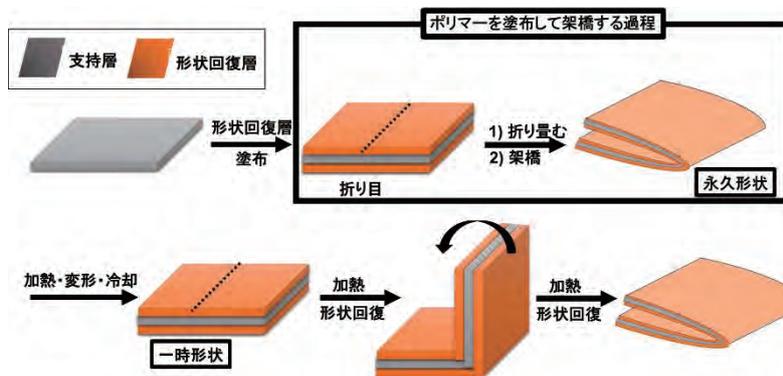


Figure 1. Preparation of shape-memory materials folding to multiply folded shapes.

細菌セルロースナノファイバーを導電性ポリマーで被覆した高含水ゲル電極の開発

大阪大学大学院工学研究科

○東垣 達也・麻生 隆彬・宇山 浩

【緒言】 生体情報を抽出または生体内代謝をエネルギーに変換するためのウェアラブルデバイスやインプラント材料が求められている。そのため、従来の金属や導電性高分子電極に代わる生体親和性の高い電極、すなわち柔軟で体内に埋め込む安全性を有し、優れた物質透過性をもつハイドロゲル電極の開発は急務である。細菌セルロース (BC) はセルロースナノファイバー (CNF) からなり、99%以上の含水率を有する生体適合性ハイドロゲルに位置づけられる。本研究では、BC の CNF 表面を導電性ポリマーで選択的に被覆し、高導電性かつ高強度なハイドロゲル電極を開発した。

【実験】 最初に、アクリロイル基導入 BC (AcBC) ゲル を作製した。次に、AcBC ゲルを *p*-スチレンスルホン酸ナトリウム水溶液に浸漬し、開始剤に過硫酸アンモニウム (APS) を用い、70°C で 24 時間反応させることで BC ゲルの CNF 表面にポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム) (PSS) をグラフト化した (BC-g-PSS)。その後、3,4-エチレンジオキシチオフェン (EDOT) の水-DMF (1:1) 分散液に浸漬し、酸化剤に APS を用い、室温で 48 時間反応させることで目的の導電性ハイドロゲル (BC-g-PSS/PEDOT) を得た。続いて、作製した BC-g-PSS/PEDOT ゲルの圧縮強度と導電率を測定し、加えて BC ゲルの CNF の積層構造を利用した導電率の異方性についても検討した。

【結果と考察】 走査型電子顕微鏡 (SEM) により BC ゲルの CNF 表面が PEDOT/PSS 層で被覆されていることがわかった (Figure 1)。すなわち、グラフトされた PSS が EDOT の重合時のテンプレートとして機能していることが示唆された。4 端子法による導電率測定から、最大で 0.3 S/cm の高い導電率を示す一方で、含水率も 92%以上保持していた。持続長の長い CNF に沿って PEDOT/PSS を導入することで、高導電性かつ高含水率を達成した。BC ゲルは CNF からなるため、水の保持力が低く、非常に弱い応力による圧縮でも水を放出して収縮する。しかし BC-g-PSS/PEDOT ゲルの圧縮試験による力学強度評価では、圧縮歪み 90%における最大応力は BC ゲルの約 70 倍に向上し、PSS を導入することで BC ゲルの脆弱性を改善できた。また、BC ゲルの CNF の積層構造に由来した導電率の面依存性も確認した。

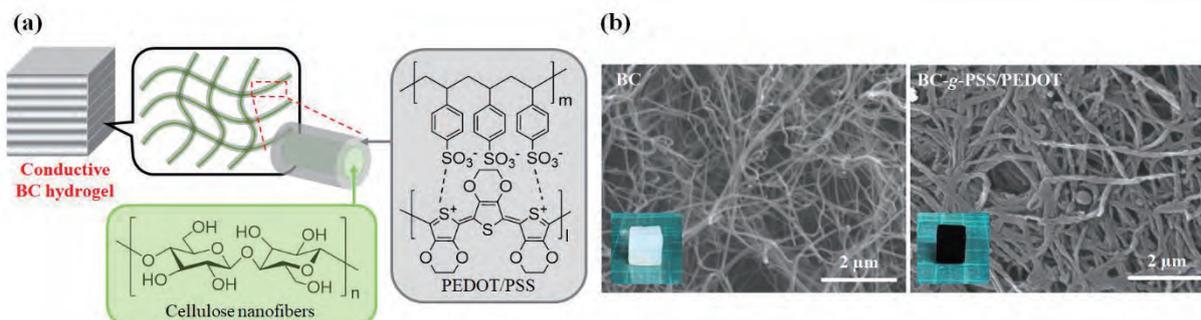


Figure 1. (a) Illustration and chemical structures of the present conductive hydrogel. (b) SEM images of BC (left) and BC-g-PSS/PEDOT (right) hydrogels.

Fabrication of gel electrodes with high water content consisting of conductive polymer coated bacterial cellulose nanofibers

Tatsuya HIGASHIGAKI, Taka-Aki ASOH and Hiroshi UYAMA

Department of Applied Chemistry, Osaka University

Tel: +081-6-6879-7365, FAX: +81-6-6879-7367, E-mail: t_higashigaki@chem.eng.osaka-u.ac.jp

低侵襲的に剥離可能な歯科材料への応用を目指した 光分解性ポリロタキサン架橋剤の合成

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 有機生体材料学分野
○三田北斗¹、有坂慶紀¹、田村篤志¹、由井伸彦¹

【緒言】 現在、歯列矯正用ブラケット装着のように除去を前提とした歯表面への人工物の接着において、レジン系セメントのような高機械的強度の接着剤が使用されている。しかし、そのようなセメントは高い接着性をもつため、除去時のエナメル質損傷が危惧されている。そこで、レジン系セメントの機械的強度を任意に調

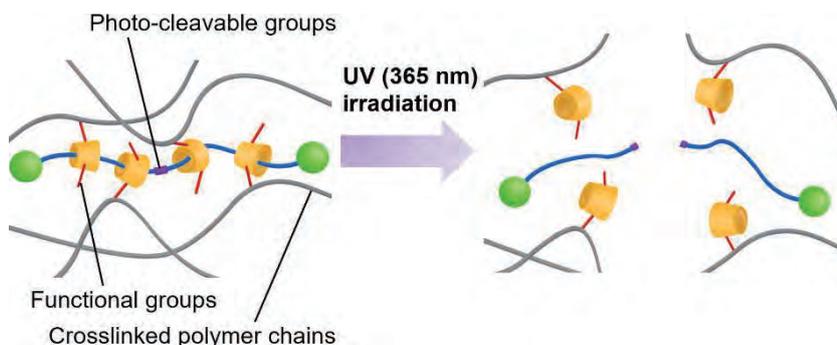


Figure 1 Schematic illustration for degradation of photo-cleavable polyrotaxane crosslinkers.

節可能な新規レジン系接着剤の構築を目指し、光分解性ポリロタキサン (PRX) に着目した。PRX は環状分子である α -cyclodextrin (α -CD) の空洞部に poly(ethylene glycol) (PEG) 等の線状高分子が貫通した超分子であり、軸高分子中に分解性の結合を導入することで任意の刺激に対する分解応答性を賦与することが可能である。軸高分子中に導入した分解性結合が一カ所でも開裂することで、PRX 構造全体の崩壊が惹起される。よって、分解性 PRX を用いることで、分解性結合数を減らすとともに迅速な分解応答が期待される。本研究は PEG 鎖内部に光分解性基である *o*-ニトロベンジル基を有し、 α -CD に *n*-ブチル基およびメタクリロイル基を修飾した光分解性 PRX 架橋剤を合成し、この架橋剤を溶解したレジンモノマーで硬化体を作製し、紫外光照射に伴う最大引張強度の変化を評価した。

【実験】 *o*-ニトロベンジル基を内部にもつ光分解性 PEG と α -CD を水溶液中で 24 時間攪拌後、生じた擬ポリロタキサンの末端をアダマンタン誘導體で封鎖し光分解性 PRX を合成した。この PRX に波長 365 nm の紫外光を 5 分間照射後、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により光分解性を解析した。次に、光分解性 PRX の α -CD に *n*-butyl isocyanate と 2-isocyanatoethyl methacrylate を修飾し光分解性 PRX 架橋剤を合成した。レジンモノマーに (+/-)-camphorquinone、2-(dimethylamino)ethylmethacrylate、光分解性 PRX 架橋剤を加えて攪拌し、波長 465 nm の可視光を 2 分間照射して硬化体を作製した。この硬化体の最大引張強度は引張試験機 (EZ-test) により測定した。

【結果および考察】 *o*-ニトロベンジル基を有した PEG と α -CD からなる光分解性 PRX を合成し、核磁気共鳴解析によりその構造を確認した。この PRX は紫外光 (365 nm) 照射により α -CD を放出し、分解したことが SEC 解析によりわかった。一方で、*o*-ニトロベンジル基をもたない非分解性 PRX は紫外光照射による分解が認められず、*o*-ニトロベンジル基の光開裂による PRX 構造の崩壊が示された。光分解性 PRX の α -CD にメタクリロイル基および *n*-ブチル基を修飾した光分解性 PRX 架橋剤はレジンモノマーに溶解し、可視光 (465 nm) 照射により硬化体を形成した。この光分解性 PRX 架橋剤硬化体の引張試験を行った結果、紫外光照射により硬化体の最大引張強度が低下することが明らかとなった。以上より、紫外光照射により機械的強度を制御しうる光分解性ポリロタキサン架橋剤を合成でき、除去時の侵襲を伴わない歯科用接着剤への応用が期待できる。

Synthesis of photo-cleavable polyrotaxane crosslinkers for non-invasively detachable dental materials.
Hokuto Santa¹, Yoshinori Arisaka¹, Atsushi Tamura¹, Nobuhiko Yui¹

¹Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-3-5280-8020, Fax: +81-3-5280-8027, E-mail: yui.org@tmd.ac.jp

血液成分との相互作用における高分子濃縮層の効果

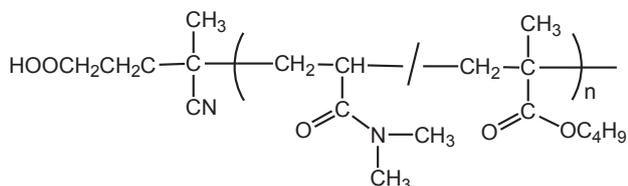
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
○舟木 健太・青木 隆史

生体内部では、細胞外は血液などの体液で満たされ、細胞内外はタンパク質などが高濃度に溶解した水環境である。細胞内外を隔てている生体膜は主にリン脂質から構成されており、極性の低い脂質部分が水環境から避けるように膜の内部に集まり、極性の高いリン酸エステル部位が水環境である膜の外側を向いて流動性を保持しながら二重層を形成している。すなわち、細胞の構造上の特徴は、タンパク質などの高濃度水溶液を覆った生体膜が動的な界面を持っていることである。

血液と接触するあらゆる人工臓器デバイスは固体状態であり、血液という液体とはその物性が大きく異なる。したがって、分子の運動性が異なる両者が接触した場合には、それぞれの運動性の違いを解消するために、固体表面の分子の運動性に合わせるように、水分子がその運動性を落として固体表面と相互作用する。さらに、水に溶解している溶質分子も、固体表面と相互作用し吸着する場合があります。固—液界面という特殊な環境により、これらの相互作用が誘発されている。われわれは、血小板などの血液細胞の接着やタンパク質の吸着を抑える固体表面を実現するためには、細胞が持っている動的な界面が必要であると考えている。

水溶性高分子の中には、高濃度になると高分子鎖同士が疎水性凝集を起こして、溶媒の水から相分離する場合があります。特に、高分子鎖が水分子と相互作用しながらもバルク水から液—液相分離し、コアセルベートを生成することがある。われわれは、このコアセルベート状態が、その内部の高分子鎖が水和した状態を保持していることから、高分子鎖の運動が維持され、バルク水に対して明確な界面を作り、界面も動的に運動している状態であると考え、この高分子濃縮層（コアセルベート）をモデル界面として利用し、この高分子濃縮層上での血小板接着について検討してきた。本研究では、水から相分離して高分子濃縮層を形成するポリマーとして、*N,N*-dimethyl acrylamide (DMAAm)と疎水性モノマーである *n*-butyl methacrylate (BMA)との共重合体を選び（スキーム1）、血液成分との相互作用の抑制について検証した。

4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid)をラジカル重合開始剤として用い、フリーラジカル重合法により片末端にカルボキシル基を有する DMAAm と BMA との共重合体(PDB)を合成した。また、血小板接着実験では、アミノ基を導入した PET 基板表面上に PDB 共重合体を化学修飾した。成人男性より採取し調製した多血小板血漿(PRP)をポリマー修飾基板に加え、37°Cで 30 分静置した後、試料表面上に接着した血小板の個数と形態変化を観察したところ、17mol%の PDB 共重合体(PDB-17)が血小板の接着数において最も低い値を示した。PDB-17 が液—液相分離したポリマー濃縮層を形成し、血小板の接着を抑制したと言える。一方、タンパク質吸着により血小板が接着凝集することから、血液凝固作用の引き金となっている。タンパク質吸着を抑制することも、人工臓器などのデバイスを活用するために重要なファクターとなる。本研究では PDB 共重合体とタンパク質との吸着実験について検証した結果を報告する。



Scheme 1. Structure formula of a PDB copolymer

The effect of a polymer-concentrated layer on the interaction with blood components

Kenta FUNAKI, Takashi AOKI

Department of Biobased Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology

Tel & Fax: +81-75-724-7820, E-mail: t-aoki@kit.ac.jp

ポリロタキサン/ゼラチンからなる伸縮性 *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発

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
 ○中野 剛志¹, 太田 誠一², 伊藤 大知^{1, 2}

【緒言】

ハイドロゲルは医療分野において幅広く応用されており、中でも *in situ* でゲル化が可能なインジェクタブルゲルは、その低侵襲性から注目されている。医療用ハイドロゲルにおいて、伸縮性を持つ部位への適用の制限が課題となっている。よって、生体適合性を持つインジェクタブルな伸縮性ハイドロゲルの開発が求められている。我々は、ゲルへの伸縮性の付与が報告されているポリロタキサン(PR)と、生体適合性材料であるゼラチンに注目した。PRは、ひも状分子をシクロデキストリンに通して両端を留め、シクロデキストリンがスライド出来る状態で閉じ込めた分子である。本研究では、シクロデキストリン部位をジオール化したPR(PR-diol)とフッ化フェニルボロン酸(FPBA)を修飾したゼラチン(Gel-FPBA)を合成した。両者を混合することで、ジオール-ボロン酸間の架橋により、伸縮性を持つ生体適合性 *in situ* 架橋ハイドロゲルの作製を検討した(Fig.1)。

【実験】

2.1 プリカーサーポリマーの合成及び評価

グリンドールを用いて PR のシクロデキストリン部位中の水酸基をジオール化し、¹H NMR、¹³C NMR で修飾を確認した。また、牛由来ゼラチンのアミノ基に対し、NHS 化した FPBA 反応させることで Gel-FPBA を合成し、¹H NMR、UV-Vis、FT-IR、TNBS アッセイにより修飾を確認した。

2.2 Gel-FPBA/PR-diol ハイドロゲルの作製及び評価

終濃度30 wt%の Gel-FPBA に対し、PR-diol をボロン酸とジオールの比で1:1(PR1eq.)、1:2(PR2eq.)となるように50℃で混合後、室温に冷却してゲルを作製した。コントロールとして Gel-FPBA のみでもゲルを作製した。得られたゲルを用いて、引張試験、動的粘弾性測定、膨潤分解試験を行った。

【結果と考察】

3.1 プリカーサーポリマーの合成及び評価

PR-diolの合成は、¹H NMR における3.2~3.8 ppm、¹³C NMR における63~66 ppm のジオール由来のピークから確認された。¹H NMR の積分比より、修飾率は63.6%と算出された。

Gel-FPBA の合成は、¹H NMR において7.3~7.6 ppm の FPBA 由来のピークから確認された。UV-vis では235、280nm に FPBA 由来のピークを確認し、FT-IR では3460~3400、1680~1630、1570~1515 cm⁻¹にアミド結合によるピークの変化を確認した。TNBS アッセイより修飾率を算出し、FPBA の当量によって5%~37%の範囲で修飾率を制御できることが確認された。

3.2 Gel-FPBA/PR-diol ハイドロゲルの評価

両者を混合することで得られたハイドロゲルはゼラチンのみのゲルに比較して高い貯蔵弾性率を示し、溶媒に浸漬した際にも1.6倍程度高い膨潤度を示した。これにより、ジオール-ボロン酸間の架橋の形成が示唆された。また、引張試験において PR-diol を加えたゲルがゼラチンのみのコントロールに比べ、破断伸長比が有意に1.5~2倍程度向上する様子が観察された(Fig.2)。以上の結果から、PR を架橋させることによるゼラチンゲルの伸縮性向上が確認された。

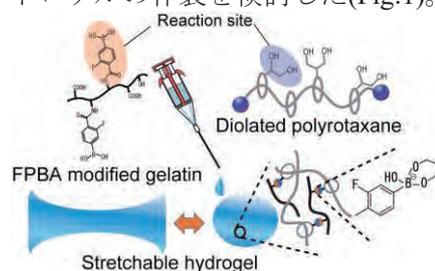


Fig.1 Schematic illustration of hydrogels composed of diolated polyrotaxane (PR-diol) and FPBA modified gelatin (Gel-FPBA)

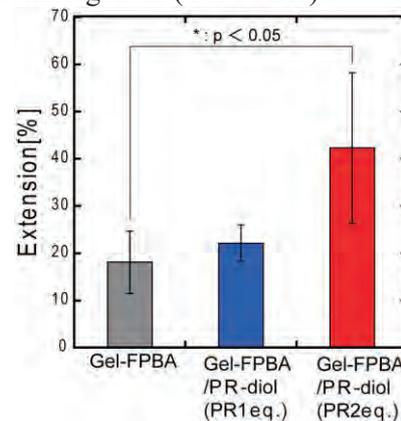


Fig.2 Comparison of the maximum extension of hydrogels.

Development of a stretchable *in situ* cross-linking hydrogel composed of polyrotaxane and gelatin
 Takeshi Nakano¹, Seiichi Ohta², Taichi Ito^{1, 2}

¹School of Engineering, The University of Tokyo ²School of Medicine, The University of Tokyo
 Tel: +81-3-5841-1425, Fax: +81-3-5841-1697, E-mail: taichi@m.u-tokyo.ac.jp

酵素固定化ゲル微粒子を用いたミネラルリゼーションシステムの構築

慶應義塾大学大学院理工学研究科

○小林 尚裕, 福井 有香, 藤本 啓二

【緒言】生物は特異的な微小環境を創り出し、生体分子の生成、その構造と活性の制御、生体反応の調節など精密に制御を行っている。骨代謝においては、破骨細胞が骨表面に接着して微小空間を創出し、酸と酵素反応によって効率的に骨吸収を行い、さらに骨芽細胞の分泌する基質小胞内部が微小反応場となり、骨の無機成分であるリン酸カルシウム(CaP)の生成(ミネラルリゼーション)を調節している。本研究ではミネラル生成の環境を創出するために、柔軟性、付着性および化学的特性を有するゲル微粒子を担体として、それに反応因子として酵素の Carbonic anhydrase (CA) と Urease を組み込んだ。CA は CO_2 を H^+ と HCO_3^- に変換する酵素であり、Urease は尿素を NH_3 と CO_2 に分解する酵素である。これら酵素をゲル微粒子に固定化し、酵素反応によって微粒子近傍に局所 pH 環境の創出を試みた。さらに、硬組織修復ツールとしての応用を見据えて、これら酵素固定化微粒子を用いて CaP の溶解および析出を試みた。

【実験】モノマーとして Methacrylic acid (MAc)、*p*-Nitrophenylacrylate (NPA) および *N,N'*-Methylenebisacrylamide (MBAAm) を用いて三元系沈殿重合を行い、活性エステル部位を有するゲル微粒子を作製した(MN 粒子)。この活性エステル部位を加水分解することで、カルボキシ基に富んだゲル微粒子を作製した(*h*MN 粒子)。次に、アミド縮合剤 DMT-MM を用いて *h*MN 粒子に CA と Urease をそれぞれ固定化した(*h*MN-CA 粒子、*h*MN-Urease 粒子)。続いて、酵素活性評価として *h*MN-CA 粒子分散液に CO_2 を通じた溶液を加えて、 H^+ 生成に伴う pH 変化を測定した。*h*MN-Urease 粒子については、尿素を添加し、 NH_3 の生成に伴う pH 変化を検出した。次に、*h*MN-CA 粒子をガラス基板に配列化させて CaP 結晶を付着させた後に CO_2 を加えて、酵素反応によって CaP 結晶の溶解を試みた。一方、*h*MN-Urease 粒子については、 Ca^{2+} とリン酸イオンの存在下で尿素を加えて、酵素反応に伴う CaP 結晶の生成を試みた。これら粒子近傍における CaP の溶解と析出の様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) によって観察した。

【結果と考察】粒径 $3.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$ で負電荷 ($-14.8 \pm 0.9 \text{ mV}$) を有する *h*MN 粒子を作製し、CA の固定化を行い、固定化密度が $3.24 \mu\text{mol/g-particle}$ の *h*MN-CA 粒子が得られた。この粒子分散液に CO_2 溶液(4°C)を加えたところ、pH の低下を促進することができた。この *h*MN-CA 粒子に CaP 結晶は強固に付着することがわかった。これは CaP と粒子表面のカルボキシ基との相互作用に起因すると考えられる。さらに、 CO_2 を添加したところ、粒子周辺の結晶に多数のポアが観察された(Fig. 1)。これは粒子近傍の pH が低下したことによると考えられる。一方、*h*MN-Urease 粒子に尿素(pH 6、 25°C)を加えたところ、pH の上昇が確認された。この粒子に Ca^{2+} とリン酸イオンの存在下で尿素を添加したところ、粒子近傍の pH が上昇し、CaP 結晶の析出が観察された。これら酵素固定化微粒子は基質存在下で局所的に pH 環境を形成することができ、CaP の溶解と析出を誘導できるツールとなることが示唆された。

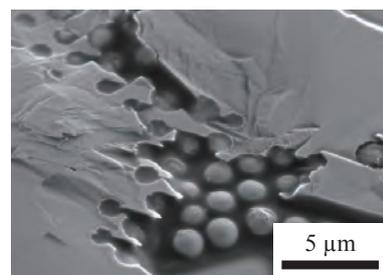


Fig. 1 Pore formation at the surface of a CaP crystal contacting with *h*MN-CA particles upon enzymatic reaction.

Development of Mineralization System by Using Enzyme-immobilized Gel Particles

Naohiro KOBAYASHI, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO

Graduate School of Science and Technology, Keio University

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

Ti への Ag⁺吸着による抗菌性付与

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, ³北見工業大学地球環境工学科

○大脇 充裕¹, 黒田 健介², 興戸 正純², 山口 花帆³, 大津 直史³

【緒言】

Ti は高強度・高靱性であり, 優れた生体適合性を示すため生体材料として広く用いられている。しかし, 単独では抗菌性に乏しいため, 金属 Ag や Ag⁺の添加などによる抗菌性の付与が試みられてきた。これまでに著者らは, Ti-Ag 合金に陽極酸化を施すことにより合金表面層に Ag⁺を含む酸化皮膜を作製し, それが抗菌性能を発揮することを報告した。その一方で, 金属イオンを含有する水溶液に, 表面を高度に清浄化した Ti を浸漬することにより, Ti 表面に金属イオンが強固に吸着し, 脱離しにくいことをすでに見出している。そこで本研究では, 表面を清浄化した Ti を Ag⁺を含む水溶液に浸漬することにより Ti 表面に Ag⁺を吸着させ, その抗菌性能を調べるとともに, 表面に吸着した各種イオンおよび表面の親水性が抗菌性能に与える影響を調べた。

【実験】

表面粗さ Ra/μm < 0.1 となるように湿式研磨を施した Ti 試料に, 180 °C の蒸留水中で 3 h 水熱処理を施した後, 試料を室温の大気中に最長 7 d 保存することで表面親水性を制御した。Ag⁺, Na⁺ など各種イオンを含む水溶液に浸漬することでイオンを吸着させた後, 蒸留水中で 5 min 超音波洗浄を行うことで Ti 表面に強固に吸着していないイオンを除去した。試料表面の表面粗さ Ra 測定 (測定範囲: 150×112 μm) にはレーザー顕微鏡を用い, 表面親水性評価には水滴接触角 (WCA) 測定 (滴下量: 2 μL) を用いた。試料表面のイオンの存在の調査には XPS 分析を用いた。また, 生体模擬環境下に保存した際の試料表面の Ag⁺吸着量の変化および試料表面からの Ag⁺放出性を調べるため, 37 °C の PBS(-)中に 7 d 浸漬した試料について, XPS による試料表面の Ag⁺吸着量の定量および ICP-AES による PBS(-)中への Ag⁺の溶出量の定量を行った。また, 試料の抗菌性能の評価として, JIS Z2801 に準拠して大腸菌および表皮ブドウ球菌を用いた抗菌性試験を行った。

【結果と考察】

処理後の試料表面はすべて Ra/μm < 0.1 のままであり, 初期表面粗さを維持していた。XPS 分析の結果, Ag⁺含有水溶液への浸漬後, 十分な試料洗浄後の表面にも Ag⁺が検出されたため, 浸漬により Ti 表面に Ag⁺が吸着しているものと考えられる。Ag⁺の吸着量は初期 WCA に依存し, WCA の上昇とともに Ag⁺吸着量が増大した。また, 吸着した Ag⁺は生体模擬環境下において脱離せず保持されていた。抗菌試験の結果, Ag⁺が吸着した試料は抗菌性を示した (Fig. 1)。この結果から, Ag⁺が放出されなくとも, 表面に Ag⁺が吸着していることにより抗菌性を示すことが明らかとなった。また, 当日は試料表面に吸着した各種イオンおよび試料表面の親水性が抗菌性能に対して与える影響についても報告する。

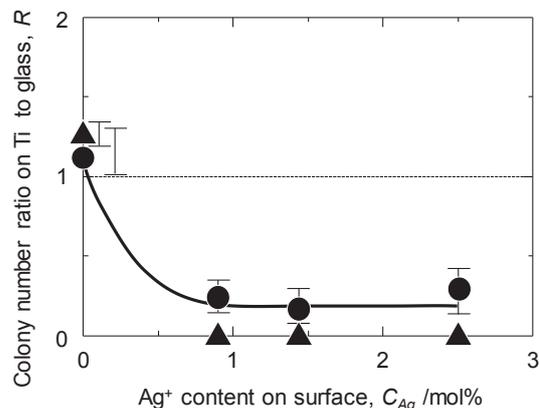


Fig. 1 抗菌性と Ag⁺吸着量

- ▲ 大腸菌
- 表皮ブドウ球菌

Antibacterial properties of Ag⁺ adsorped Ti

Mitsuhiro Owaki¹, Kensuke Kuroda², Masazumi Okido², Kaho Yamaguchi³, Naofumi Ohtsu³

¹Department of Materials Process Engineering, Nagoya University ²Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University ³School of Earth, Energy and Environmental Engineering, Kitami Institute of Technology
Tel: +81-52-789-3230, E-mail: oowaki.mitsuhiro@i.mbox.nagoya-u.ac.jp

各種抗菌ナノ粒子のアナフィラキシー様反応惹起性の評価

¹近畿大学大学院生物理工学研究科

○梅田 晃治¹, 石丸 佳樹¹, 東 慶直¹, 古菌 勉¹

【緒言】血管内留置カテーテル使用による細菌感染症は、重篤な病態悪化等を引き起こすことが懸念され、解決手段が求められている。しかしながら我が国では、クロルヘキシジン/スルファジアジン銀含侵カテーテルを用いた患者にアナフィラキシーショックが発生したことを発端として、抗菌カテーテルの使用に制限がかけられている。そこで我々は、カテーテルのコーティング材料として各種イオンをドーブしたハイドロキシアパタイト(HAp)ナノ粒子の開発を行い、抗菌性制御について検討してきた。本研究では、各種抗菌ナノ粒子を用いて、アナフィラキシー(様)反応の程度を *in vitro* で検討を行った。

【実験】実験には各種イオン[フッ素(F)、亜鉛(Zn)、チタン(Ti)]をドーブした HAp ナノ粒子を用いた。まず、各種抗菌ナノマテリアルおよびヒスタミンの遊離を促進する薬剤 (compound48/80、グルコン酸クロルヘキシジン) をヒト肥満細胞(HMC-1)に添加し、ELISA 競合法を用いることで、HMC-1 から分泌されるヒスタミン濃度を定量した。その後、HAp 自身が本評価系の阻害因子となる可能性を検討するため、ヒスタミンデヒドロゲナーゼおよび ELISA 競合法を用い、ヒスタミンの normal-HAp (n-HAp) への吸着および n-HAp による HMC-1 に対する免疫反応の影響を検討した。

【結果と考察】各種抗菌 HAp ナノ粒子添加による HMC-1 からのヒスタミン分泌について評価した。ポジティブコントロールである compound48/80 およびグルコン酸クロルヘキシジンは高いヒスタミン分泌を誘導した。各種抗菌ナノ粒子を添加した場合、ヒスタミン分泌は細胞単独とほぼ同程度であった (Figure 1)。その後、ヒスタミンの n-HAp への吸着を検討した結果、n-HAp 添加の有無でヒスタミン標準液の吸光度に差が見られなかったため、ヒスタミンは HAp にほとんど吸着されないと考えられた。また、n-HAp による HMC-1 に対する免疫反応の影響を検討した結果、n-HAp 添加の有無で HMC-1 から分泌されたヒスタミン濃度に差異が認められなかった。以上より、HAp は本評価系に影響を与えないことが明らかとなった。これらの結果から、各種抗菌 HAp ナノ粒子はヒスタミン分泌を誘導しなかったため、アナフィラキシー(様)反応を惹起しにくいと考えられた。また、compound48/80 等では細胞膜受容体を介し、脱顆粒が生じることが報告されているが、各種抗菌ナノ粒子ではヒスタミンが過剰に分泌されなかったため、細胞膜受容体への刺激は微弱であることが推察された。以上のことから、これらの HAp ナノ粒子をカテーテルにコーティングすることにより、アナフィラキシー(様)反応を惹起しにくいデバイスの創出が期待される。また併せて、抗菌性に優れた銀ナノ粒子のヒスタミン放出試験を実施し、比較検討したので報告する。

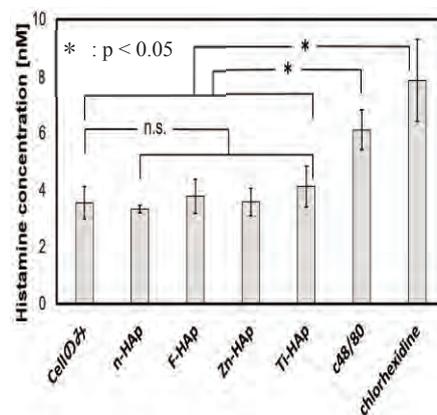


Figure 1. Anaphylactoid reaction test by measuring histamine concentration (n=3)
c48/80 : compound48/80
chlorhexidine : chlorhexidine-gluconate

Evaluation of anaphylactoid reaction using various antibacterial nanoparticles

Koji Umeda¹, Yoshiki Ishimaru¹, Yoshinao Azuma¹, Tsutomu Furuzono¹

¹Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University

Tel: +81-736-77-3888, Ext: 5206, E-mail: furuzono@waka.kindai.ac.jp

長時間安定に細胞膜を修飾できるグラフト型ポリマーの分子設計と精密合成

東京大学大学院工学系研究科

○Yum Jongmin, 井上 祐貴, 石原 一彦

【緒言】

ポリマーを用いる細胞表面改質は、多様な機能性官能基及び生理活性物質を細胞表面に固定することにより、再生医療、生体組織工学、免疫療法などの細胞治療分野で研究されている。細胞表面上のポリマー修飾は、共有結合、静電相互作用、疎水性相互作用を用いた方法がある。その中で、リガンド-受容体タンパク質間の相互作用によるポリマー修飾は、対応するタンパク質受容体特異的な結合性を持つことにより、位置および密度の制御や機能変換から有意義であると考えた。ここで、リガンド-受容体タンパク質間の相互作用する部分に注目して、ポリマー構造の観点から細胞膜との相互作用を解明することは重要な要素である。また、外部からの刺激により修飾したポリマーの構造や特性を変化させることで、この相互作用に関しても明確になると考えた。そこで、本研究では、多様な構造的パラメータを制御できるグラフト型ポリマーを用い、長時間安定に細胞膜表面に留まることができるポリマーを創製することを目的とする(図1)。ポリマーに、細胞親和性、細胞膜タンパク質との結合性を付与するため、生体分子非認識特性を有するリン脂質ユニットからなり、ターゲットとなる細胞膜タンパク質としてインテグリンを、そのリガンド分子として Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD)を選択した。長時間安定に細胞膜を修飾できるポリマーの構造を、リガンド分子の数や運動性、グラフトポリマーの水環境下での溶存状態をパラメータとして決定する。

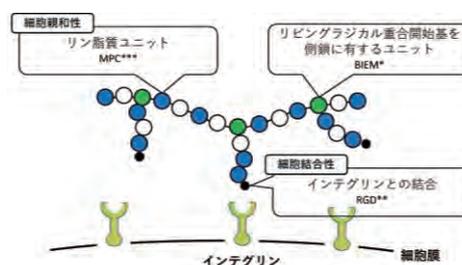


図1 レセプターに特異的に反応するポリマーを利用した細胞膜の修飾

【実験】

1. 構造明確なグラフトポリマーの合成

RAFT 重合により、2-(2-bromoisobutyryloxy)ethyl methacrylate (BIEM) ユニットと 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) からなるランダムコポリマー(PMBr)を合成した。合成した PMBr をグラフトポリマーの主鎖として用いることで、BIEM ユニットから ATRP 法により poly(MPC) (PMPC) を伸長させた(PMPC-graft-PMBr)。側鎖の PMPC の量を 25、50、100 とした。

2. PMPC を用い、click chemistry 反応条件を検討

ポリマーの末端での官能基変換を検討するために、ATRP 重合法で合成した PMPC の末端臭素原子に対して、アジド化反応及びプロパルギルアミンを用いた Huisgen 環化付加反応を行った。

【結果と考察】

グラフトポリマー合成結果、グラフトポリマーの主鎖の転化率が高く、ポリマー中のモノマーユニット組成が仕組み組成に近いポリマーを得ることができた。また、側鎖の合成においては、MPC の転化率はほぼ 90% であり、GPC 測定による得られた多分散度が低いことから、明確な構造を有するグラフトポリマーを合成することができた。

さらに、PMPC にアジド化反応した後、FT-IR 測定により、アジド基に由来するピークが観測できた。さらに、アジド化反応した PMPC の Huisgen 環化付加反応結果、加えるプロパルギルアミンの濃度を増やすと末端変換する割合が大きくなり、約 60% のポリマー末端のアジド基がアミノ基に変換された。講演では得られたグラフトポリマーでの細胞膜修飾についても報告する。

Molecular Design and Precision Synthesis of Graft Polymer Capable of Stable Modifying Cell Membrane for Long Time

Jongmin Yum, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara

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

Tel: +81-03-5841-7128, Fax: +81-03-5841-8647, E-mail: yum@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

両親媒性 MPC ポリマーブラシ表面の疎水性相互作用がタンパク質吸着に与える影響

東京大学大学院マテリアル工学専攻

○味寺克哉, 井上祐貴, 石原一彦

【緒言】 タンパク質や細胞との相互作用を調節できるバイオマテリアル表面を作製することは生体に触れる医療デバイスを作製するために必要である。デバイス表面で誘起される細胞・組織レベルの生体応答はタンパク質吸着が発端となる。本研究では構造明確な親水性 - 疎水性の高密度ランダムコポリマーブラシを用いて原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定により、タンパク質の吸着に直結する分子間相互作用の観点からタンパク質の吸着過程を明らかにする。ポリマー表面で複雑に作用する分子間相互作用のうち疎水性相互作用力を高精度に解析する。表面上で働く分子間相互作用力を定量的に解析することで、各表面へのタンパク質の吸着挙動およびそれに起因する細胞接着を制御できるバイオマテリアル表面構造の設計指針の提案につながる。

【実験】 表面の親水・疎水状態を制御するために、表面開始型原子移動ラジカル重合(SI-ATRP)により、Si 基板上に 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)および *n*-butyl methacrylate (BMA)からなる構造明確なランダム型ポリマーブラシ表面を構築し、表面特性を解析した。fibronectin を固定化したカンチレバーとポリマーブラシ表面とのフォースカーブ測定を行うことで、タンパク質の吸脱着時に生成する疎水性相互作用力を解析した。また Quartz crystal microbalance (QCM)を用いて測定されたタンパク質吸着量との関連性を調べた。

【結果と考察】 表面元素、接触角、表面電位および膜厚測定より種々のポリマーブラシ層が構築されたことが示された。Fig.1 に各ポリマーブラシ表面と fibronectin の分子間相互作用力と吸着量を示す。AFM による相互作用力測定から、MPC ユニット組成が 0%、10%のポリマーブラシ表面で、カンチレバーの離脱時のみ引力が測定され疎水性相互作用力は自由拡散した疎水基を持つ分子の接触後に初めて働くことが示され、接触角によって推定される表面自由エネルギーに依存することが示された。fibronectin 吸着量と相互作用引力には正の相関関係があった。fibronectin 吸着量は、ポリマーブラシ表面との疎水性相互作用力に強く影響を受けることが示された。

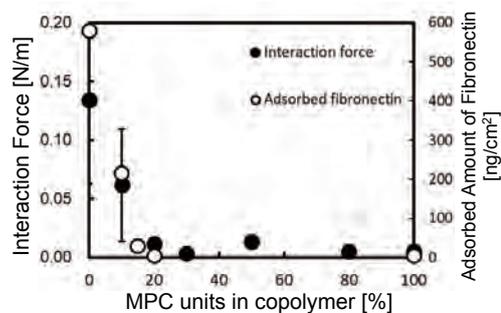


Fig. 1. ポリマーブラシ層の MPC ユニット組成と fibronectin との相互作用力、吸着量の関係

The effect of hydrophobic interaction force on protein adsorption using amphiphilic copolymer brush layer

Katsuya MITERA, Yuuki INOUE, Kazuhiko ISHIHARA

Department of Materials Engineering, The university of Tokyo

焼結条件による多孔質チタンの加工特性と評価に関する研究

¹ 大分工業高等専門学校専攻科 機械環境システム工学専攻, ² 大分工業高等専門学校 機械工学科

○岩田 隆正¹, 坂本 裕紀²

【緒言】現在の歯科医療では、インプラントの材料としてチタンが使われている。チタンが生体材料として用いられる理由には、人体に無害で組織適合性も良いなどの点が挙げられる。しかし、チタンをそのまま人体に使用すると様々な問題点も出てくる。その一つに弾性係数の違いがある。純チタンの弾性係数は 105~110GPa, 人骨の弾性係数は 17~20GPa となっている。ここに生じた弾性係数の差をなくすために、多孔質化という手段が用いられる。多孔質化とは直径 100~125 μ m ほどの粉末状にしたチタンに放電プラズマ焼結を施し、結合させる方法である。この操作により、チタン粒同士の結合の隙間に気孔が生まれ、弾性係数を人骨に近づけることが可能である。さらにこの気孔に骨組織が侵入することで、チタンと骨の強固な結合も可能である。

本研究では、歯科インプラントに使用できる多孔質チタンを作成するため、焼結条件によるさまざまな特性の違いをまとめ、気孔率、SEM による表面観察、圧縮試験、ねじ切り加工による加工特性によって評価することを目標とする。

【実験】プラズマ放電焼結機を用いて焼結条件の違う 5 種類の多孔質チタンを作成した。各焼結条件の多孔質チタン試料をそれぞれ複数個抜粋し、圧縮試験を行った。また、SEM を用いて多孔質体の結合状態を確認し、粒同士の結合の仕方、気孔の様子などの焼結条件の違いによる結合状態の差を観察した。さらに、NC 旋盤によるねじ切り加工を施し、各条件の加工特性を切削時の状態や顕微鏡、SEM による観察から評価した。試験片を牛骨に埋め込み、圧縮試験や疲労試験なども行う。

【結果と考察】圧縮試験では、圧縮強度には保持時間が大きく影響していることが分かり、保持時間を長くすることによって、硬さが向上する性質も見られた。縦弾性係数は気孔率と関係することから、気孔率を下げることでより圧縮強度を高くできることが確認できた。さらに縦弾性係数を向上させるには焼鈍などの熱処理があり、より人骨に近づけることが可能であると考えられる。SEM 観察では、気孔率による見た目の大きな違いは見られなかったが、結合痕のクレーターのサイズを測定することで、結合度と圧縮力の関係が明らかになった。粒同士をより強く結合させるためには、圧縮力を上げなければならないが、気孔率の低下も考え、条件を検討しなければならない。ねじ切り加工では、条件により目つぶれが発生した。圧縮力が高かった条件に特に目つぶれが多く見られた。これは圧縮力と気孔率に関係しているが、切削の条件を変更することで改善される可能性があると考えられた。今後は、切削の条件に関しても目つぶれが発生しないように設定していく必要がある。

Study on processing characteristics and evaluation of porous titanium by sintering condition

Takamasa Iwata¹, Yuki Sakamoto²,

¹Mechanical and Environmental Systems Engineering Major, National Institute of Technology, Oita College

²Department of Mechanical Engineering, National Institute of Technology, Oita College

Tel: +81-97-552-6879, Fax: +81-97-552-6975, E-mail: ysak@oita-ct.ac.jp

歯科において実際に用いられるインプラントの製作と評価に関する研究

¹ 大分工業高等専門学校専攻科 機械・環境システム工学専攻, ² 大分工業高等専門学校 機械工学科

○佐藤 諒弥¹, 坂本 裕紀²

【緒言】

純チタン及びチタン合金は、軽量かつ人体に無害で組織適合性が良いため、現在歯科インプラントや人工骨などの生体内でよく用いられている。しかし、チタンと骨の弾性係数が異なることから（チタン：105～110GPa, 人骨：17～20GPa）、ストレスシールドリングが発生し人口骨周辺の骨が痩せてしまうことや、骨とインプラントが直接結合しにくいことが問題となっている。

そこで、チタンを多孔質化することでチタンを人骨の弾性係数に近づけることができるほか、チタンの表面積が増加することと、気孔の中に骨が浸透することで、インプラントと骨が強固に結合することが期待されている。

しかし、多孔質チタンをインプラントに用いるには強度、弾性係数が不足している状態であり、それらの改善が求められている。

したがって、本研究では多孔質チタンの強化のために、放電プラズマ焼結を施し、試料を作る際の条件を変更し、インプラント製作に最適な強度と多孔性を有する多孔質チタンの選定を行った。そして、焼鈍することで強化した多孔質チタンとの物性の比較を行った。さらに、多孔質チタンの低い弾性係数を改善するために、緻密なチタンと多孔質チタンを複合した材料の製作、評価を行った。

【実験】

多孔質チタンの試料は、100～125 μ mのチタン粉末を放電プラズマ焼結することで製作した。強度向上のためにSPSを行う際の圧縮力と保持時間を変更し3種類の試料を製作した。

多孔質チタンの弾性係数向上のために試料の中央部に緻密なチタンの軸を有した多孔質チタンの製作を試みた。複合材料の製作方法は、予め材料の芯となる部分を緻密なチタンで製作し、それをカーボンダイスの中に設置する。その芯を覆う形でチタン粉末を投入し放電プラズマ焼結を行うことで製作した。

以上の多孔質チタンの試料と複合材料の試料を圧縮試験やSEM観察を行い評価した。

【結果と考察】

複合材料の加工をする際は、多孔質部が脆く旋盤での加工が困難な部分があったため研磨をすることで調整した。

SEM観察の結果から放電プラズマ焼結を行う際の保持時間の延長と圧縮力の増加は、両方ともに多孔質チタンの圧縮強度向上に有効であることが分かった。また、今回製作した試料の圧縮強度は、焼鈍を行った試料の圧縮強度には及ばなかったが、更に放電プラズマ焼結の条件を変更することで多孔質チタンの強化を期待できる。

また、気孔率との相関を見てみると、圧縮力を上げた際は保持時間を長くした際より気孔率が下がっている。多孔質チタンは強度が高く気孔率が大きいものが生体材料として最適である。従って、今後多孔質チタンを製作する際は、保持時間をさらに延長したものを作るべきであると考えられた。

Study on production and evaluation of the implant which is really used in dentistry

Ryouya Satou¹, Yuki Sakamoto²

¹Mechanical and Environmental Systems Engineering Major, National Institute of Technology, Oita College

²Department of Mechanical Engineering, National Institute of Technology, Oita College

Tel: +81-97-552-6879, Fax: +81-97-552-6975, E-mail: ysak@oita-ct.ac.jp

Au-Nb 合金への Ti, Zr 添加による磁化率, 硬さへの影響

¹徳島大学大学院 生体材料工学分野, ²徳島大学大学院 歯科放射線学分野
○宇山 恵美¹, 菅田 栄一², 浜田 賢一¹

【緒言】血管拡張ステントや脳動脈瘤クリップといった金属製デバイスが生体内に存在すると、磁気共鳴画像法 (MRI) による撮影時に、金属製デバイスを起因とした偽像 (アーチファクト) が生じる。これにより金属製デバイス周囲組織の正確な画像情報が得られず診断に支障をきたすといった問題が、MRI の高磁場化にともない深刻化している。そこで、MRI 撮影時にアーチファクトを生じない合金として、生体とほぼ同じ磁化率-9 ppm かつ高硬度を示す Au 合金の研究・開発を進めている。これまでに研究してきた Au 合金のうち、Au-Nb 合金は Au₂Nb (磁化率-23 ppm) 析出により磁化率が減少するため、熱処理によって磁化率の調節可能で、かつ Au₂Nb の析出により硬さが向上することが明らかとなった。また、Au-Ti 合金や Au-Zr 合金は、Au に少量添加するとそれぞれ Au₄Ti、Au₄Zr が析出し、磁化率の変化はわずかだが、硬さが飛躍的に向上することが分かった。そこで、本研究では Au-Nb 合金に第3元素として Ti および Zr を添加した合金 Au-Nb-Ti 合金、Au-Nb-Zr 合金が、磁化率-9 ppm を示しつつ高硬度が得られるか調べた。

【実験】Au-12Nb-1.5Ti 合金 (mass%, 以下同じ)、Au-12Nb-1.5Zr 合金をアルゴンアーク溶解で作製し、1000℃にて1週間均質化処理を施した。その後、インゴットを大気中にて300℃で熱間圧延し、溶体化処理を1000℃にて20時間行った。その後、600℃、800℃で0.5~20時間時効処理を行い、磁化率、ビッカース硬さ、相構成を調べた。

【結果と考察】磁化率を Fig 1、ビッカース硬さを Fig 2 に示す。Au-12Nb-1.5Ti 合金の相構成は、溶体化処理後は単相で、時効処理後は Au₂Nb (磁化率-23 ppm)、Au₄Ti (磁化率 0) が析出した。600℃、800℃処理後はともに磁化率は低下し、-9 ppm を示しうることが分かった。また、ビッカース硬さは析出硬化により向上した。Au-12Nb-1.5Zr 合金の相構成は、溶体化処理後は単相で、時効処理後は Au₂Nb、Au₄Zr (磁化率-17 ppm) が析出した。磁化率は、800℃処理後では Au-12Nb-1.5Ti 合金と同様に低下したが、600℃処理後では増加し、Au-12Nb-1.5Ti 合金とは異なる挙動を示した。析出物の磁化率が負であるにもかかわらず、合金全体の磁化率が増加するメカニズムについては今後解明する必要がある。また、ビッカース硬さは Au-12Nb-1.5Ti 合金より低い値を示したが、Au-12Nb 合金より向上した。ここで、磁化率および硬度は析出物とその量に依存すると考えられ、Au-12Nb-1.5Ti 合金の Ti と同等の mol%相当を示すのは Au-12Nb-3Zr 合金であるが、この合金は脆く圧延困難で実用合金に適さないことが分かった。よって、Au-Nb-Ti 合金は Au-Nb-Zr 合金と比較して、圧延性と高硬度の両立が可能であるといえる。

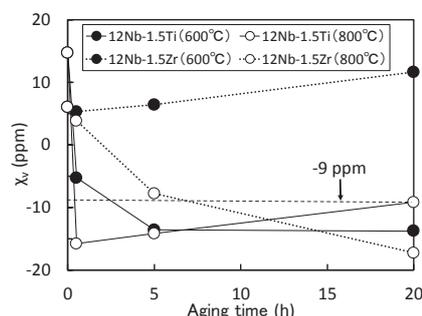


Fig 1 : 磁化率

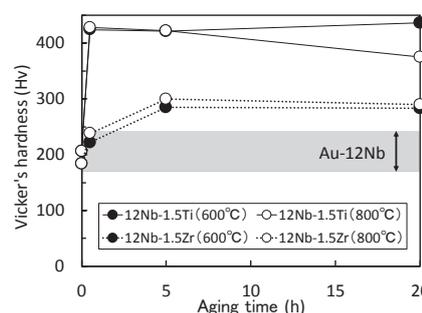


Fig 2 : ビッカース硬さ

Effect of Ti and Zr addition on susceptibility and hardness of Au-Nb alloy

Emi Uyama¹, Kenichi Hamada¹, Eiichi Honda²

¹Department of Biomaterials and Bioengineering, Tokushima University Graduate school, ²Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Tokushima University of Graduate school

Tel: +81-633-7333, Fax: +81-633-9125, E-mail: uyamanikofu@tokushima-u.ac.jp

細胞カプセル素材の開発

味の素株式会社 イノベーション研究所

○大角 幸治、藤井 友博、岡松 順子、北原 吉朗

【緒言】 ホルモン欠損性疾患の治療のために細胞カプセルを移植する治療が始まっている。他家細胞を移植する際には、細胞をホストの免疫から保護するために透過性カプセル等に包む必要がある。現在、ブタ膵臓細胞をマイクロカプセルに封入した製品が糖尿病治療用にロシアで上市されている。この製品は3層から成り、第1層はブタ膵臓細胞をアルギン酸で包んでおり、第2層はポリオルニチンによりカプセルの膨張を防ぎ、第3層はアルギン酸によりホストからの免疫反応を防いでいる。カプセルからはインスリンがグルコース濃度依存的に分泌され糖尿病の治療に有効であるが、カプセルが膨張しやすい、異物反応による線維化が起きるなどの課題が明らかになっている。我々は、耐久性に優れ、かつ異物反応の起きにくいマイクロカプセルの作成を目的に本研究を開始した。

【実験】 マイクロカプセルの強度を向上させる目的で、アルギン酸 (Wako 社製 No. 192-09995) にシステインをアミド結合させた。システインは自然酸化により S-S 結合を形成するためカプセルの強度向上が期待できる。合成したアルギン酸—システインを 100mM CaCl₂ 溶液に滴下して、アルギン酸—システインカプセル (Alg-Cys) を作成した。Ellman 法によってマイクロカプセル内の SH 基を定量し、時間経過と共に S-S 基が生成することを確認した。低カルシウム条件下 (クエン酸添加、EDTA 添加、生理食塩水) におけるマイクロカプセルの耐久性評価も行った。次いで、異物反応を抑制する目的で異物反応抑制低分子 (Nature Biotechnology, 34(3), p345, 2016) をマレイミドを介してカプセル表面に結合させた。得られた修飾マイクロカプセル (Alg-Cys-L) について生理食塩水条件下での耐久性を評価した。アルギン酸カプセル (Alg), 修飾マイクロカプセル (Alg-Cys-L) を C57BL マウスの皮下に移植して 28 日後に取り出し、カプセルの形状、カプセル表面での異物反応について評価を行った。

【結果と考察】 アルギン酸—システインを CaCl₂ 溶液に滴下して作成したカプセル (Alg-Cys) は、低カルシウム条件下でも優れた耐久性を示した。一方でアルギン酸カプセル (Alg) ではカプセルの膨張、溶解が認められた。S-S 結合の形成により、Ca のキレート作用が失われてもマイクロカプセルは球形を維持できることが明らかになった。また、修飾マイクロカプセル (Alg-Cys-L) は C57BL マウスに皮下移植後、28 日目でも球形かつ透明であった。一方で、アルギン酸カプセル (Alg) は 28 日後ではマイクロカプセルの形状が崩れていた。Masson Trichrome 染色の結果、修飾マイクロカプセル (Alg-Cys-L) はアルギン酸カプセル (Alg) に比べて、移植後 14 日の時点では線維化の遅延が認められた。異物反応抑制低分子の効果により異物反応の進行が抑制されたと考えられた。我々が設計した修飾マイクロカプセル (Alg-Cys-L) は既存カプセルに比べて耐久性に優れ、かつカプセル表面での異物反応も抑制されていた。

Development of new material for cell encapsulation

Koji Ohsumi, Tomohiro Fujii, Yoriko Okamatsu, Yoshiro Kitahara

INSTITUTE FOR INNOVATION, AJINOMOTO., INC.

Tel: +81-44-210-5864, Fax: +81-44-210-5874, E-mail: koji_ohsumi@ajinomoto.com

血管内皮細胞増殖因子捕捉型 RNA アプタマー修飾材料の性能評価

¹国立医薬品食品衛生研究所, ²株式会社リボミック, ³東京大学医科学研究所
 ○森下 裕貴¹, 野村 祐介¹, 福井 千恵¹, 中村 義一^{2,3}, 靛島 由二¹

【緒言】RNA アプタマーは、抗体に代わる標的認識が可能な次世代分子として期待されている。RNA アプタマーは化学合成可能であることから、医療機器分野に応用できれば、抗体や成長因子等を固定化した材料と比較して、コスト、安全性、品質管理等の点で優れた機能性材料が創成できる可能性が高い。本研究では、埋植部位への血管内皮前駆細胞の遊走や血管新生を促進可能な医用材料の開発を目指し、活性を保持した状態で血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を選択的に捕捉する RNA アプタマーを修飾した材料を作製し、その機能を評価した。

【実験】VEGF₁₆₅ を標的とした試験管内選択法によりアプタマー候補 RNA を選定後、最適化した RNA アプタマー (42mer) を取得した。当該アプタマーの VEGF ファミリーとの交差性及び RNA アプタマー/VEGF₁₆₅/VEGF 受容体三者複合体形成能は表面プラズモン共鳴法により評価した。三者複合体形成時の VEGF₁₆₅ 活性は、ヒト臍帯静脈内皮細胞に RNA アプタマーと VEGF₁₆₅ の混合溶液を添加した際の細胞増殖を指標として WST アッセイにより評価した。VEGF₁₆₅ 捕捉能は、RNA アプタマーを固定化した金板を作製し、VEGF₁₆₅ 添加血清中でインキュベート後、金板表面に吸着した VEGF₁₆₅ を回収し、ELISA により定量した。

【結果と考察】表面プラズモン共鳴法による解析の結果、取得した RNA アプタマーは、RNA アプタマー/VEGF₁₆₅/VEGF 受容体複合体を形成可能であることが明らかとなった。また、ランダム配列 RNA と比較して、ヒト VEGF₁₆₅、齧歯類 VEGF₁₆₄ へ高い結合性を有す一方で、ヒト VEGF_{165b} には高い結合性を示さないことが確認された。これらの結果から、RNA アプタマーは、齧歯類を用いて *in vivo* での機能評価が可能であること、血管新生活性を持つ VEGF₁₆₅ スプライズバリエーションのみを捕捉可能であることが判明した。WST アッセイによる解析の結果、ヒト臍帯静脈内皮細胞に RNA アプタマーと VEGF₁₆₅ を共添加しても、VEGF₁₆₅ 単独添加時と比較して、細胞増殖率は変化しなかったことから、当該 RNA アプタマーは、活性を保持した状態で VEGF₁₆₅ を捕捉可能であることが明らかとなった。RNA アプタマーを固定化した金板上への VEGF₁₆₅ 吸着挙動を評価した結果、未修飾の金板や、核酸修飾の対照として poly dT を固定化した金板と比較して、VEGF₁₆₅ の吸着量が有意に増加することが確認された (図 1)。今後、RNA アプタマー修飾材料の *in vivo* における有効性を評価していく予定である。

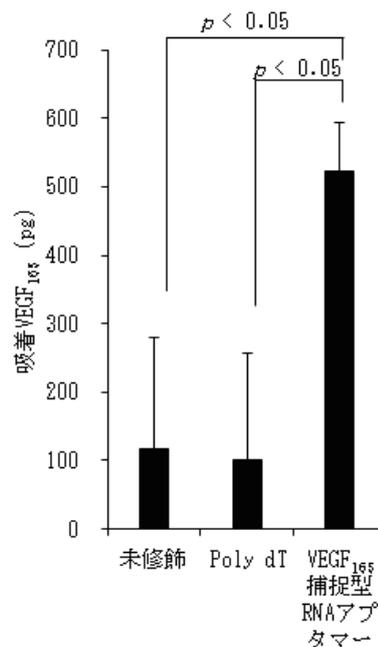


図 1. VEGF₁₆₅ 捕捉型 RNA アプタマーを固定化した金板上への VEGF₁₆₅ 吸着挙動

Performance evaluation of an RNA aptamer-modified biomaterial capturing vascular endothelial growth factor

Yuki Morishita¹, Yusuke Nomura¹, Chie Fukui¹, Yoshikazu Nakamura^{2,3}, Yuji Haishima¹

¹National Institute of Health Sciences, ²Ribomic Inc., ³Institute of Medical Science, University of Tokyo
 Tel: +81-44-270-6540, Fax: +81-44-270-6611, E-mail: haishima@nihs.go.jp

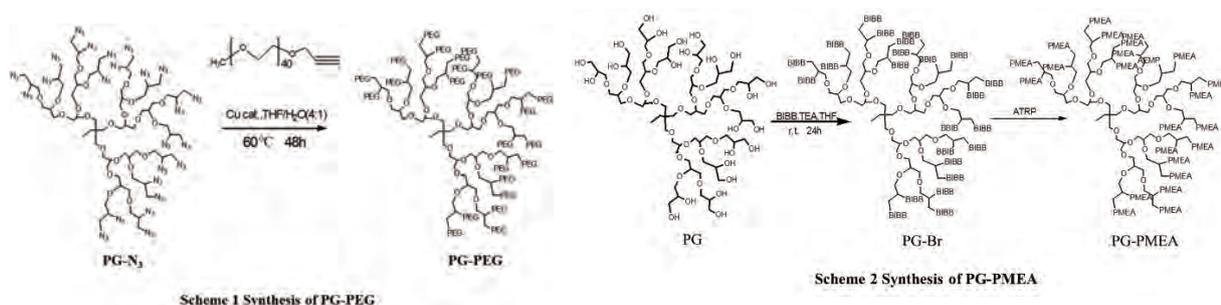
コアシェル型の新しい抗血栓性材料の合成と評価

¹山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻, ²九州大学先端物質化学研究所
○佐藤 力哉¹, 阿部 雅大¹, 菅沢 杏子¹, 菅原 なつみ¹, 田中 賢²

【緒言】コアシェル型高分子材料は、分子量が大きくても各種溶媒に対する溶解性に優れていることが知られている。そこで本研究では、コアに各種分野で応用研究されている Polyglycidol (PG) を用い、シェルとして高い血液適合性を示す Poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) や Polyethylenglycol(PEG) を、PG の末端水酸基の反応性を利用して導入した 2 種類の新規高分子材料(PG-PEG および PG-PMEA)を合成し、それらの抗血栓性を評価することを目的とした。

【実験】

Trimethylolpropane (TMP)を開始剤として用いて、2-propenylchloride, OsO₄ との反応を三度繰り返すことによりコアの分岐構造を制御した PG の合成を行った。PG-PEG の合成では末端水酸基のトシル化、アジド化を行った後、エチニル基をもつ Polyethylenglycol monomethylether とのクリック反応により PG 末端へ PEG の導入を行った。(Scheme1) 次に、PG-PMEA の合成では ATRP により PG 末端へ PMEA 構造を導入した。(Scheme2) 生成ポリマーの水との接触角、DSC による中間水の測定また血小板粘着試験等により血液適合性を評価した。



【結果と考察】

PG-PEG の構造は ¹H-NMR による解析から確認した。DSC による中間水の測定から、生成ポリマー中に、中間水の存在が確認できた。水との接触角および抗血栓性評価においては、生成ポリマーが水溶性であったため有用なデータを得ることができなかった。また PG への PMEA の導入は ¹H-NMR による解析から、一本鎖当たり最大 32 程度の重合度であることが確認できた。ここで得られたポリマーと原料の PG との水との接触角を比較したところ、PG に比べ、生成したポリマーの水との接触角が大きくなったことからポリマー表面に PMEA が分布していることが示唆された。また DSC による中間水の測定から、生成ポリマー中に中間水の存在が確認できた。さらに生成ポリマーを用いたタンパク質吸着試験および ELISA 法による Fb γ 鎖の活性評価では PMEA 単体に比べても優れた結果となった。本発表ではこれらの詳細について報告する。

Synthesis and Characterization of Novel Core-Shell Type Antithrombogenic Materials

Rikiya Sato¹, Masahiro Abe¹, Kyoko Suganuma¹, Natsumi Sugawara¹, Masaru Tanaka²

¹Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University

²Institute for Materials Chemistry and Engineering Soft Materials Chemistry, Kyushu University

Tel: +81-238-26-3087, Fax: +81-238-26-3177, E-mail: riki@yz.yamagata-u.ac.jp

空気非接触/拍動循環型閉鎖系回路による高分子材料の血液適合性評価

¹国立医薬品食品衛生研究所医療機器部,²日本医療研究開発機構,³東京大学大学院工学系研究科,
⁴早稲田大学理工学術院先進理工学研究所,⁵九州大学先端物質化学研究所

○宮島敦子¹, 小森谷薫¹, 比留間瞳¹, 野村祐介¹, 森下裕貴^{1,2}, 加藤玲子¹, 井上祐貴³, 鮫島啓
4, 松橋祐輝⁴, 青山祐介⁴, 熊谷直紀⁴, 保延慶紀⁴, 頼卓然⁴, 平井晴香⁵, 小林慎吾⁵, 田中賢⁵,
岩崎清隆⁴, 石原一彦³, 葩島由二¹

【緒言】インプラント型の循環器系医療機器では、長期間に渡って血栓形成等を起こさないことが要求されるが、血栓性評価法は未だ国際的に整合されていない。血栓性試験については、血液凝固系、血小板系及び補体系因子に関連する評価マーカが例示されているが、具体的な試験方法が記載されていないと共に、各マーカの有用性も未知な部分が多い。現在までの研究により、我々は、開放実験系において、高分子材料の血液適合性評価マーカとして血液凝固系因子 (TAT) 及び血小板系因子 (β -TG, PF4) が有用であることを見出した。

本研究では、空気非接触/拍動循環血液回路を利用した閉鎖実験系により、中間水量の異なる新規高分子材料の血液適合性をこれらのマーカを指標として評価し、開放実験系の試験結果 (第 39 回大会:2P-045) と比較検討した。

【実験】高分子材料として、PMEA, PEt2A, PMC3A, PEtEA, PEt2MA, PBuA, PEA, PMC6A, PEtEMA 及び PMPC (陰性対照) を用いた。拍動循環閉鎖系血液回路は、拍動ポンプ、リザーバー、逆流防止弁及び延長チューブをコネクタで接続した内容量 55 mL の回路で、内面を高分子材料で各々コーティング後、回路内部をヒト全血で満たし、拍動下で 37°C、1 時間循環させた。血液サンプルは、採血直後、回路組み立て開始時、拍動循環開始 1 分後及び 1 時間後に回収し、評価マーカ毎 (TAT, β -TG, PF4) に適切な阻害剤処理を行った。各評価マーカ量は ELISA 法により測定した。

【結果と考察】各高分子材料で内面コートした閉鎖系回路にて、血液を循環開始 1 分後及び 1 時間後における TAT、 β -TG 及び PF4 の量はほぼ等しく、材料と血液が接触を開始した回路組み立ての間に既に評価マーカの変動が生じていると考えられた。各マーカ値の変動量に基づき、高分子材料は血液適合性良好群 (PMEA, PEt2A, PMC3A, PEt2MA) と不良群 (PBuA, PEA, PMC6A, PEtEMA) に大別された。開放実験系における試験結果と比較すると、評価マーカの発現量はいずれも開放系が高く、TAT で平均 59 倍、 β -TG で 16 倍、PF4 で 5 倍であった。開放実験系では、反応開始時に比べてシート非浸漬の対照群でも β -TG、PF4 の値が大きく上昇していたことから、両実験系における評価マーカ発現挙動の差異は、シート切断面の存在及び空気接触の有無に基づく血小板活性化度の相違等に由来すると考えられた。PEtEA は、閉鎖系循環開始 1 分後の評価マーカ値が中程度であったが、1 時間後には高値を示し、血液適合性不良群に分類された。PEt2MA は、過去に実施した開放実験系において血液適合性不良群に分類されたが、今回実施した閉鎖実験系では血液適合性良好群に分類された。PEt2MA の血液適合性については更なる検証が必要であるが、少なくとも開放実験系では偽陰性は観察されなかった。閉鎖系と比較して、開放実験系は操作性に優れており、試験に要する被験材料量及び血液量も少なく、複数の被験材料を同時に評価できる利点もあることから、高分子材料の血液適合性を評価する簡易スクリーニング法として有用であると考えられる。しかしながら開放実験系で偽陽性となる可能性があることから、状況に応じて空気非接触/拍動循環血液回路実験系での検証を考慮する必要があると考えられる。

Evaluation of the blood compatibility of polymers using a closed pulsatile circuit system

Atsuko Miyajima¹, Kaoru Komoriya¹, Hitomi Hiruma¹, Yusuke Nomura¹, Yuki Morisita^{1,2}, Reiko Kato¹, Yuuki Inoue³, Kei Sameshima⁴, Yuki Matsushashi⁴, Yusuke Aoyma⁴, Naoki Kumagai⁴, Yoshinori Honobe⁴, Zhouran Lai⁴, Haruka Hirai⁵, Shingo Kobayashi⁵, Masaru Tanaka⁵, Kiyotaka Iwasaki⁴, Kazuhiko Ishihara³, Yuji Haishima¹

¹Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, ²Japan Agency for Medical Research and Development, ³School of Engineering, The University of Tokyo, ⁴Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, ⁵Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University.

Tel: +81-44-270-6544, Fax: +81-44-270-6545, E-mail: miyajima@nihs.go.jp

フロキュレーションによるセルロースナノファイバーと細胞の自己組織化

¹ 物質・材料研究機構国際ナノアーキテクニクス研究拠点, ² 山形大学有機材料システム研究推進本部, ³ 京都大学化学研究所

○吉川 千晶¹, 干場 隆志², 榊原 圭太³, 辻井 敬亘³

【緒言】

私たちの研究グループでは植物細胞壁から単離されるセルロースナノファイバー (CNF) の物理特性 (高弾性・高強度)、圧倒的資源量 (安価に入手可能)、生体適合性に着目し¹、これを用いた足場材料の開発に注力している。本研究では CNF 表面にアニオン性濃厚ポリマーブラシ (CPB) を付与し、フロキュレーションによる細胞との自己組織化を企図した²。

具体的にはグラフト密度の異なるアニオン性ポリマーを CNF 表面にグラフトし、グラフト密度や CNF 濃度が細胞とのフロック (凝集塊) 形成や細胞機能に与える影響について検討した。

【実験】

表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) の開始基をエステル化反応により CNF へ導入した (CNF-Br)。ここでは反応時間を変えることで開始基密度 (DS) を調整した。DS は元素分析およびフーリエ変換型赤外分光測定 (FT-IR) により決定した。次に、SI-ATRP により CNF に poly(p-styrenesulfonic acid sodium salt) (PSSNa) をグラフトした。重合後、フリーポリマーの分子量、分子量分布をゲルパーミエーションクロマトグラフィー測定により決定した。グラフト量は元素分析および FT-IR により決定し、フリーポリマーの分子量を用いてグラフト密度を算出した。得られた PSSNa 付与 CNF は肝細胞モデル (HepG2) と共培養し、フロック (凝集塊) 形成を位相差顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡により確認し、細胞機能を定量 PCR により評価した。

【結果と考察】

DS の異なる CNF-Br を用い、SI-ATRP によりグラフト密度の異なる PSSNa を CNF にグラフトした (準希薄ポリマーブラシ (SDPB) および CPB)。得られた CNF を培地に分散させ、HepG2 細胞と所定濃度で共培養したところ、CPB をグラフト

した CNF のみが細胞とフロックを形成することが確認された。また、興味深いことに、CNF-CPB の濃度に依存してフロックサイズが制御できることや中空構造が形成されることが明らかとなった。さらに、CNF-CPB が CNF-SDPB や未修飾 CNF に比べて HepG2 細胞の機能を向上させることも遺伝子レベルにより確認している。この事実は CNF-CPB の足場材料としての有用性を示すものである。詳細については当日発表する。

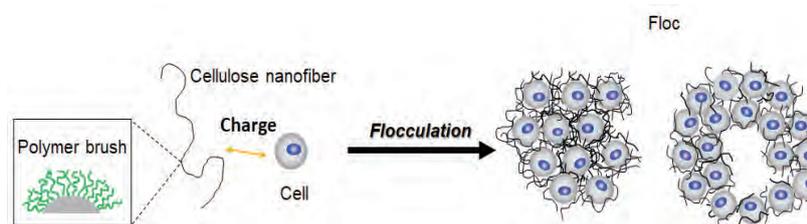


Figure 1. Flocculation of CNF-CPB with HepG2 cells.

参考文献

1. Lin, N.; Dufresne, A. *Eur. Poly. J.* **2014**, *59*, 302-325.

2. Yoshikawa, C.; Hoshihara, T.; Sakakibara, K.; Tsujii, Y. *ACS Applied. Nanomate.* **2018**, *1*, 1450-1455.

Flocculation of Cells by Cellulose Nanofibers Modified with Concentrated Polymer Brushes

Chiaki Yoshikawa¹, Takashi Hoshihara², Keita Sakakibara³, Tsujii Yoshinobu³

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

² Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University

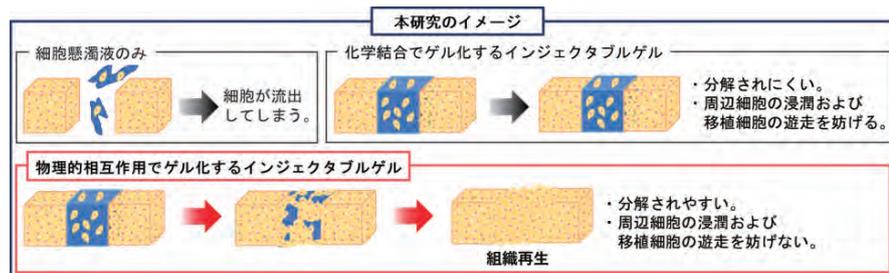
³ Institute for Chemical Research, Kyoto University

E-mail: yoshikawa.chiaki@nims.go.jp and sakaki@scl.kyoto-u.ac.jp

可逆的相互作用を用いた細胞移植ハイドロゲルの作製

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
○穴水 美菜, 田畑 泰彦

【緒言】細胞移植治療は、組織の再生・修復を促す再生治療において魅力的なアプローチである。その中で、注射による細胞移植は外科的手術を必要としないため、患者への負担が少ない治療法として注目されている。しかしながら、細胞懸濁液のみの投与では、移植細胞が、目的の治療部位から流出してしまい、必要部位での細胞の治療効果は必ずしも高いものではない。そこで、移植細胞を目的部位に留める技術の研究開発が望まれている。その技術の一つとして、移植細胞とともに目的部位に注射後、速やかにゲル化し、移植細胞を目的部位に留めるインジェクタブルゲルがある。これまでの研究では、合成高分子を用い、ゲル化に化学結合を利用しているものが多く、生体内での分解が遅く、移植細胞がゲル内で増殖、移動できないという問題があった。本研究の目的は、生体適合性の高分子を可逆的な相互作用によってゲル化させることにより、生体内での分解が速く、移植細胞がゲル内で増殖、移動できる性質をもつインジェクタブルゲルを作製することである。本研究では、生体内での使用前例のあるゼラチンとアルギン酸を用いている。異なる割合で混合したゼラチン-アルギン酸のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)と種々の濃度の塩化鉄(3)/PBS溶液を混合することにより、in situでゲル化するシステムを考案した。作製したハイドロゲルの分解消失性、およびハイドロゲルに封入した細胞の生存・増殖性について調べた。また、細胞を封入したハイドロゲルを生体内に注射した後の細胞の挙動について検討した結果についても併せて報告する。



【実験と結果】アルギン酸(重量平均分子量(Mw)2,300,000、キミカ株式会社より供与)とゼラチン(Mw100,000,等電点5.0、新田ゼラチン株式会社より供与)を異なる割合で含むPBS溶液を種々の濃度の塩化鉄(3)/PBS溶液を混合した。水溶液の流動性の変化を観察することにより、ハイドロゲル形成を評価した。アルギン酸、ゼラチン、および塩化鉄(3)の濃度の増加とともに、ハイドロゲルの形成が認められた。これは、用いた物質の濃度の増加とともに、架橋点が増加したためであると考えられる。作製したハイドロゲルを1mlのPBS中に投入、37°Cで数日間、振とうした。時間ごとに上清を採取し、溶出したアルギン酸およびゼラチンを定量することで、ハイドロゲルの分解消失を評価した。その結果、時間とともに、ハイドロゲルの消失が認められた。細胞をアルギン酸とゼラチン/PBS混合液に懸濁させた。これを塩化鉄(3)/PBS溶液と混合することで、細胞をハイドロゲル内に封入した。ハイドロゲルへの封入1および3日後に、生細胞数を計測することによって、ハイドロゲル封入後の細胞生存率を算出した。その結果、ゼラチンの濃度の増加とともに、3日後における細胞生存率は増加した。また、ハイドロゲル封入1日および3日後の細胞数を比較したところ、ハイドロゲル内では有意に細胞が増殖していることを観察した。

Preparation of cell transplantation hydrogels based on reversible interaction

Mina Anamizu and Yasuhiko Tabata

Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawaracho Shogoin, Sakyo-ku Kyoto 606-8507, Japan

Tel: +81-075-751-4868, Fax: +81-075-751-4646, E-mail: anamizu.mina.62s@st.kyoto-u.ac.jp

破骨細胞・骨芽細胞活性を制御するリン酸化ナノセルロースからなる人工骨の開発

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】

人工骨は、超高齢社会に突入した我が国において、骨欠損に対する治療法として重要である。ハイドロキシアパタイトに代表される人工骨は、生体活性を有しているため、骨補填材として広く使用されている。より低侵襲な治療に向けて、インジェクション可能な人工骨の開発が行われているが、分解速度が速すぎるため、骨再生が完了する前に材料が吸収されるという課題があった。

本研究では、インジェクション可能であり、破骨細胞および骨芽細胞活性を制御することで分解速度が制御可能な人工骨を開発することを目的とする (Figure 1)。アレンドロン酸を導入したリン酸化ナノセルロース (pNC) とリン酸三カルシウムをコンポジット化した人工骨を作製し、破骨細胞および骨芽細胞機能に対する影響を評価した。

【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、そこにアレンドロン酸 (AL) を加え、2-ピコリンボラン存在下で、還元のアミノ化反応によって AL を修飾した pNC を作製した。リン酸三カルシウム (TCP) と pNC を種々の濃度で混合することで、ナノコンポジット化し、アパタイト形成能および骨接着性を評価した。また、pNC が、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) による破骨細胞形成に与える影響および、TCP-pNC に対するマウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1) の細胞接着性を評価した。

【結果と考察】

セルロースに AL を導入することで pNC が作製可能であった (Figure 2a)。TCP と pNC を混合することで得られる TCP-pNC ナノコンポジットは、インジェクション可能であり、疑似体液中でのアパタイト形成能および骨接着性を有していた。また、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色の結果より、pNC は破骨細胞形成を阻害することが示された (Figure 2b)。pH に応答して pNC を徐放する本材料は、破骨細胞の活性に応答して、破骨細胞形成を抑制すると期待される。さらに、TCP-pNC は骨芽細胞の細胞接着性を向上させた (Figure 2c)。以上の結果より、本材料は、破骨細胞・骨芽細胞機能が制御可能な新規な人工骨として有用であると考えられる。

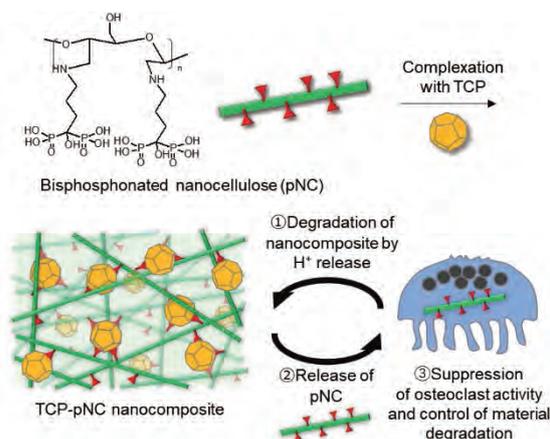


Figure 1. Schematic of pNCNF nanocomposite and regulation of osteoclast activity.

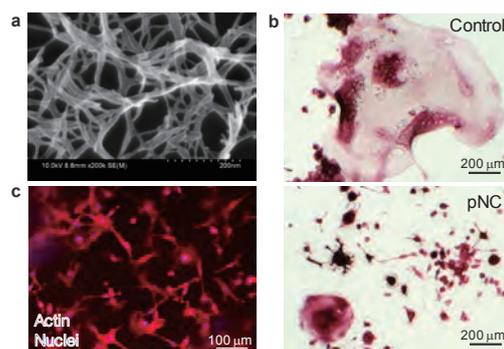


Figure 2. (a) SEM image of pNC. (b) TRAP staining of osteoclasts exposed to pNC. (c) Fluorescence microscopy image of MC3T3-E1 cultured on TCP-pNC nanocomposite.

An injectable artificial bone of bisphosphonated-nanocellulose that regulate osteoclast/osteoblast activity

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

SDS-PAGE を用いた材料表面上へのタンパク質吸着挙動解析

¹北見工業大学 医療材料研究室,²名古屋大学 材料表界面工学研究グループ
○川上 拓野¹, 庄司 拓巳¹, 黒田 健介², 大津 直史¹

【緒言】

生体埋入後の材料表面における細胞接着の挙動は、生体内で材料表面に吸着しているタンパク質に依存し、タンパク質吸着は、生体内に存在するタンパク質の種類やその濃度、あるいは材料表面の化学的特性や形状などに支配される。材料表面の性質を制御することで、この吸着挙動を自由にコントロールできるようになれば、新しい生体材料の開発につながるであろう。ところで、これまでである一種類のタンパク質の吸着挙動をそれぞれ個別に解析した研究はあったが、性質の違う複数のタンパク質が同時に材料に吸着する場合（競合吸着）の挙動を解析した研究は見当たらない。我々の研究室では SDS-PAGE 活用して表面に吸着した複数のタンパク質を分離し、それぞれを定量分析するプロセスの開発に成功した¹⁾。そこで本研究では様々な材料表面に複数タンパク質の競合吸着を行い、SDS-PAGE 分析を用いてこの吸着タンパク質の分離・定量を行い、競合吸着挙動を解析することを試みた。

【実験】

試料として、チタン (Ti) 基板をエメリー紙で #1200 のまで研磨したもの（未処理 Ti; 水接触角 $91.5^\circ \pm 9.0$ ）、 180°C の蒸留水中に 3 時間水熱処理することで表面を親水化したもの（水熱処理 Ti; 水接触角 $10.5^\circ \pm 3.4$ ）、コロナ放電で親水化処理したポリスチレン (PS)、以上の 3 つを用いた。これら試料を、アルブミン (BSA)、リゾチーム (LSZ) およびフィブリノーゲン (Fib) を、単体または同時に含む PBS 溶液中に浸漬させ、300rpm で振とうしながら 37°C で 60 分間保持することでタンパク質を吸着させた。その後試料を、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液中で 10 分間超音波洗浄することで、吸着タンパク質を SDS 溶液中に完全に抽出した。その後 SDS-PAGE でこの抽出液に含まれるタンパク質の存在比を調べた。尚、浸漬させるタンパク質溶液の濃度は、合計が 25mg/ml になるように調整した。

【結果と考察】

図 1 は、BSA および LSZ を単独で、あるいは同時に含む溶液中に試料を浸漬した後、その表面に吸着したタンパク量を SDS-PAGE で測定したものである。まず、未処理 Ti と水熱処理 Ti を比較すると、水熱処理 Ti の方が LSZ の吸着量が顕著に増加した。これは親水性を向上させたことでチタン表面がより負に帯電し、プラス電荷を持った LSZ を引き付けたためだと考えられる。また高分子の PS 表面上では、Ti と比較して、BSA および LSZ ともに吸着量が増加していた。これは PS の表面が Ti と同様に負に帯電しているためだと考えられる。また、BSA と LSZ を競合吸着させた場合、すべての試料表面において合計吸着量が増加していることが見て取れる。これは、それぞれのタンパク質が静電的反発等により互いの吸着を大きく阻害しないことを示唆する。以上より、タンパク質の吸着は、材料表面の帯電およびタンパク質の電荷状態に大きく左右される事が明らかとなった。

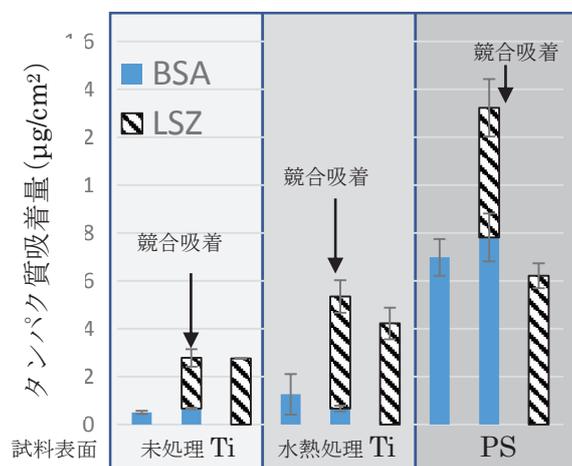


図 1 各試料表面上に吸着した BSA および LSZ の量

1) 2018 年 春季日本金属学会 吸着タンパク質分別定量のための表面タンパク質抽出方法の検討 川上 拓野, 大津 直史

Analysis of protein binding behavior on the material surface using SDS-PAGE

Takuya Kawakami¹, Takumi Syoji¹, Kensuke Kuroda², Naohumi Ohtsu¹

¹Biotechnology and Environmental Chemistry Kitami Institute of Technology

²Nagoya University Material Table Interface Engineering Research Group

Tel: 0157-26-9561, E-mail: m1852500026@std.kitami-it.ac.jp

非一様弾性場・非定住培養による間葉系幹細胞の品質保持

¹九州大学 先端物質化学研究所, ²国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部

○ 森山 幸祐¹, 久保木 タッサニーヤ¹, 澤田 留美², 辻 ゆきえ¹, 江端 宏之¹, 佐々木 沙織¹, 山本 安希¹, 田中 和沙², 河野 健², 木戸秋 悟¹

【緒言】間葉系幹細胞(MSC)は多分化能や種々の有用なサイトカイン生産能を有することから、再生医療等製品における細胞源として注目される幹細胞である。しかし一方で、MSC の特性は細胞ロット間におけるばらつきが大きいことが問題として挙げられており、その品質を保証する標準的な培養系の構築が強く望まれている。MSC 品質変化の要因の一つとして細胞外環境の力学的因子の影響が挙げられる。近年、培養基材からの力学的刺激(メカノシグナル)の入力履歴の記憶に伴う不可逆的な分化偏向の誘導が、MSC の品質変化に起因していることが報告されており、メカノシグナル入力 of 精密制御を可能とする培養力学場の構築が課題となっている。

この問題に対し本研究では、弾性パターンニングゲルを培養基材として利用した MSC 未分化保持培養系の構築を目指す。硬-軟領域を有する弾性場において MSC の非定住運動が実現すれば、各領域に対応した分化偏向が連続的に誘導されることで、メカノシグナル入力の履歴を消去できると考えられる。その結果、不可逆的な分化偏向が抑制され、未分化状態を保持した培養系が構築できると考えた。本発表では細胞運動に伴うメカノシグナル入力の動的制御を可能とするゲル基材の設計及びその基材上で培養した MSC の網羅的遺伝子解析の結果について報告する。

【実験】高分子材料としてスチレン基を側鎖に修飾した光硬化性ゼラチン(StG)を用い、光開始剤(sulfonyl camphorquinone)を含むゲル前駆溶液を調整後、60 mW/cm²の連続光を照射することで、ベースとなる低弾性率ゲルを作製した。PC 制御型パターン照射装置を用い、ベースゲルにパターン光を追加照射することで弾性パターンニングゲルを作製した。作製したパターンニングゲル上に MSC を 1.5×10³ cells/cm² となるように播種し、タイムラプス観察を 24 時間行った。細胞が基材上を非定住運動していることを確認するため、硬-軟領域における細胞の滞在時間を求めた。また、パターンニングゲル上で 4 日間培養を行った後、RNA を単離し、mRNA 発現の網羅的解析を行った。

【結果と考察】異なる分化偏向を誘導する弾性率条件として軟領域を~2 kPa、硬領域を>20 kPa と設定した。しかしながら、このような弾性率非一様場において MSC は硬領域指向性運動(Durotaxis)を誘起する。つまり運動に伴うメカノシグナル入力の振動を実現するためには、Durotaxis による硬領域への定住を回避する必要がある。

この問題に対して、硬-軟領域のパターン形状の最適化による非定住運動の実現を目指した。これまでに我々は、硬領域が軟領域に向かって凸の形状を有する弾性境界で、軟領域指向性運動(負の Durotaxis)が誘起されることを明らかにしている[1]。そこで、硬領域が三角形状のパターンニングゲルを考案した[2]。三角形の辺では Durotaxis が、各頂点から負の Durotaxis が誘起されることで非定住運動が実現すると考えた。三角形の辺を 150 μm に設定したゲル上で MSC の培養を行い(Fig. 1, left)、硬-軟領域に滞在した時間を求めた結果、MSC は各領域を~4 時間周期で非定住運動していることを確認した(Fig. 1, right)。

さらに網羅的遺伝子解析結果から、パターンニングゲル上培養後の MSC は通常使用されるプラスチック皿や均一弾性ゲル上に比べ、運動及び増殖、分化に関連する遺伝子群の顕著な発現上昇が観察され、MSC の品質保持培養への可能性が示唆された。

【参考文献】 [1] Ueki, A., Kidoaki, S. *Biomaterials* **2015**, *41*, 45-52. [2] 特願 2018-044437.

Quality assurance of mesenchymal stem cells via nomadic cultivation on heterogeneous elastic field

Kosuke Moriyama¹, Thasaneeya Kuboki¹, Rumi Sawada², Yukie Tsuji¹, Hiroyuki Ebata¹, Saori Sasaki¹, Aki Yamamoto¹, Kazusa Tanaka², Ken Kono², Satoru Kidoaki¹

¹Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

²Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences

Tel: +81-92-802-2507, Fax: +81-92-802-2509, E-mail: kidoaki@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

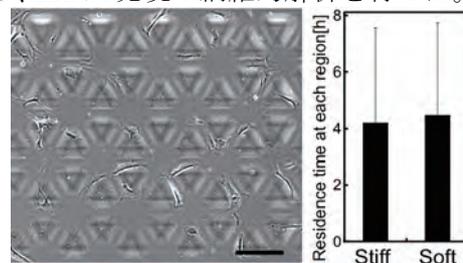


Figure 1. Left: Phase-contrast image of MSC on microelastically-patterned gels with triangular stiff regions. Scale bars: 200 μm. Right: Mean residence time at each region (n=20).

異種脱細胞骨格を用いた気管移植における脂肪幹細胞の有用性

長崎大学大学院医歯薬総合研究科 腫瘍外科学分野

○久永真, 土谷智史, 石井光寿, 溝口聡, 福田明子, 小畑智裕, 濱崎景子, 松本桂太郎, 永安武

【目的】異種移植はドナー臓器不足の解決方法として世界中で様々な研究がなされている。その際、異種抗原に対する急性拒絶反応が問題となるが、その対応として我々の施設では脱細胞骨格を用いた気管移植を行っているが、完全に異種抗原を除去することは困難で免疫抑制剤の使用が不可欠である。近年、間葉系幹細胞の免疫抑制作用が注目されており、特に脂肪幹細胞は他由来の幹細胞と比較して低侵襲で多量に採取可能である。今回我々は脱細胞化豚気管支骨格のラットへの移植に対する脂肪幹細胞を用いた免疫抑制効果の検討を行ったので報告する。

【対象及び方法】豚(LWD)脱細胞化気管支をそのままラット(Brown Norway)へ気管移植した。その際同モデルへ 1×10^6 の脂肪幹細胞を投与し(n=5)、各群の7日後の病理学的、血清学的検討を行った。A群；脱細胞化なしの豚気管支、B群；脱細胞化施行群、C群；脱細胞化+脂肪幹細胞投与群。

【結果】HE染色においてはC群で移植気管内腔の狭窄や周囲炎症細胞の波及が他群に比べ少なく、免疫染色ではCD4陽性細胞はA群では認められたが、BおよびC群では認められなかった。CD8陽性細胞数はAおよびB群に対しC群では優位に少なかった。血清学的検査においてC群での各種炎症サイトカインの低下を認めた。

【考察】異種組織骨格では、脱細胞化に加え脂肪幹細胞投与で免疫反応はさらに抑制された。

Title: Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate rejection in a heterotopic decellularized tracheal transplantation model

Makoto Hisanaga, Tomoshi Tsuchiya, Mitsutoshi Ishii, Satoshi Mizoguchi, Akiko Fykuda, Tomohiro Obata, Keiko Hamasaki, Keitaro Matsumoto and Takeshi Nagayasu^{1,6}

Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8501, Japan

Tel: +81-95-819-7304 Fax: +81-95-819-7306 E-mail: hisanagamakoto@gmail.com

ケアダイン シールドによる象牙質の再石灰化について

株式会社ジーシー

○吉満 亮介, 熊谷 知弘

【緒言】

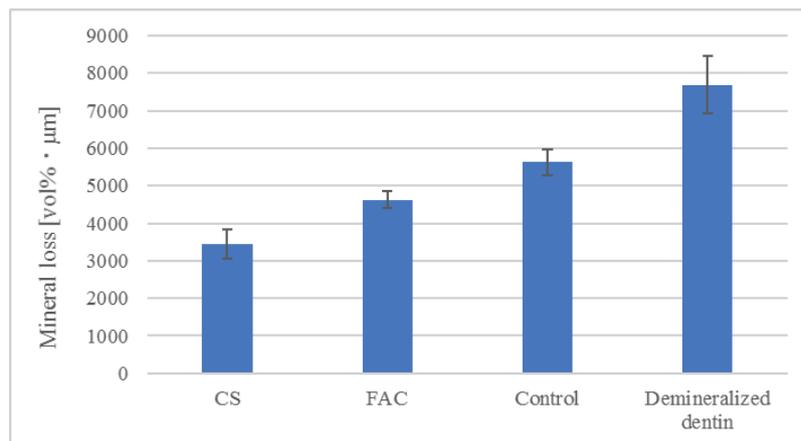
歯質根面はう蝕リスクが高いため、抗菌、脱灰抑制、再石灰化等の効果を有する材料が求められる。そこでジーシーでは新規機能性フィラーとして亜鉛、フッ素、カルシウムを含有するBioUnion フィラー、さらにBioUnion フィラーを配合するケアダイン シールドを開発した。本製品はBioUnion ナノフィラー分散液とリン酸水溶液から成り、歯面に塗布することでBioUnion ナノフィラー、リン酸亜鉛等のクリスタル粒子層を形成し、亜鉛、フッ化物、カルシウムイオンを溶出する。本研究ではケアダイン シールドによる根面象牙質の再石灰化について評価した。

【実験】

#1200 耐水研磨紙にて研磨した牛歯歯根象牙質に直径 3mm の穴をあけたテフロンシールを貼り試験面とした。脱灰液(50mM 酢酸, 1.5mM CaCl_2 , 0.9mM KH_2PO_4 , pH4.5)にて37°C, 60時間脱灰後、試験面にケアダイン シールド(CS), フルオロアルミノシリケートガラス塗布材(FAC)をそれぞれ塗布した(コントロール:塗布無)。その後、人工唾液(20mM HEPES, 30mM KCl, 0.2mM MgCl_2 , 0.7mM CaCl_2 , 4mM KH_2PO_4 , pH7.0)にて37°C, 4週間浸漬した。試験面部を厚さ1mmにスライスし、 μCT を用い透過像を撮影し、画像解析にて解析した。

【結果と考察】

再石灰化試験の結果、CS および FAC のミネラルロスコントロールよりも低い値を示した($p < 0.05$)。さらにCSのミネラルロスはFACよりも低い値を示した($p < 0.05$)。FACはフッ化物イオンを溶出するのに対し、CSはフッ化物イオンだけでなく亜鉛イオン、カルシウムイオンも溶出する。カルシウムイオン、フッ化物イオンは脱灰した歯質に取り込まれハイドロキシアパタイト、フルオロアパタイトとして結晶成長し、再石灰化を促進することは広く知られている。亜鉛イオンについてもカルシウム沈着を促進することや、Scholzite($\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Hopeite($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)などの結晶を形成することが報告されている。以上のことにより、亜鉛、フッ素、カルシウムイオンを溶出するケアダイン シールドは高い再石灰化効果を有していることが示唆された。



Effects of CAREDYNE SHIELD on remineralization of root dentin

Ryosuke Yoshimitsu, Tomohiro Kumagai

GC Corporation

Tel: +81-3-3965-1233, Fax: +81-3-3965-1655, E-mail: ryosuke_yoshimitsu@mb.gcdental.co.jp

カラーコンタクトレンズの摩擦特性に関する予備的検討

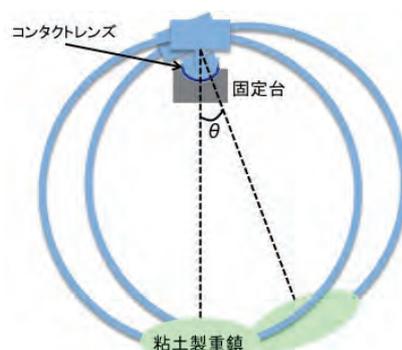
¹ 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部, ² 東邦大学大学院医学系研究科 眼科学講座,
³ 北里大学 医療衛生学部 医療工学科 臨床工学専攻, ⁴ 株式会社シード 研究開発部

○中岡 竜介¹, 岩下 紘子¹, 堀 裕一², 馬淵 清資³, 酒井 利奈³, 氏平 政伸³, 松永 透⁴,
 齋島 由二¹

【緒言】平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金特別研究事業「カラーコンタクトレンズの規格適合性に関する調査研究」において、市販カラーコンタクトレンズ (CL) の色素局在性を TOF-SIMS を用いて解析した結果、一部のレンズで色素が表面に露出している事例が確認された。装着した CL は瞬きする毎に上まぶた又は角膜と摩擦し、その程度によっては物理的影響により上皮障害を起こしうることが知られている。カラー CL の使用に由来する眼障害発生の原因の一つとして、不適正使用が挙げられるが、実臨床ではレンズ自体の品質が疑われる症例も報告されている。カラー CL に含まれる色素と摩擦特性との相関性について検討した研究は少ないと共に、過去の報告ではレンズ全体の摩擦特性を評価できない実験系を用いているのが現状である。

そこで本研究では、カラー CL の摩擦特性とその使用に由来する眼障害発生の相関性を評価する一環として、色素局在部位が判明しているカラー CL の摩擦係数を振子式摩擦測定装置により解析し、色素局在部位がレンズの摩擦特性に与える影響を評価する予備的検討を行った。

【実験】今回使用した振子式摩擦測定装置の概略を右図に示した。シリコン製接着剤により試料となる CL を振子中の半球に接着し、生理食塩水を 0.4 mL 加えた PET 製白蓋に設置した後、初期角度 30° で振子を振動させ、1 振動毎の減衰角度を画像撮影装置の映像から読み取り、下式によりレンズの摩擦係数 f を算出した。



$$f = \frac{L \cdot \Delta\theta}{4r}$$

L : 重心までの距離

$\Delta\theta$: 1 振動毎の減衰角度

r : レンズ摩擦面の半径

試料には、上述した特別研究で用いた市販カラー CL の中から色素局在部位の異なる製品を複数選択した。また、市販の透明 CL と Pigment Yellow139 をまぶた側に塗布したレンズ (PY-CL) を対照として使用した。

【結果と考察】振子式摩擦測定装置により算出された透明 CL の摩擦係数は 0.03 であった。一方、カラー CL の摩擦係数は 0.03-0.11 であり、透明 CL と比較していずれも高値を示した。PY-CL の摩擦係数は 0.13 であり、今回評価した試料中で最も高い値を示すことが判明した。また、色素局在部位がまぶた側のレンズの摩擦係数は、角膜側に色素が存在するレンズよりも高くなる傾向が認められた。これらの結果から、透明 CL と比較して、カラー CL は色素露出の有無を問わず、摩擦係数が増加すると共に、色素局在部位と摩擦係数には一定の相関性があることが示唆された。今回の予備的検討では、レンズの材質やベースカーブの違いによる影響を考慮していない。今後、それらの影響を個別に評価し、カラー CL の摩擦特性へ与える影響を検討すると共に、得られるデータの信頼性を向上させるため、生体環境を模した実験系を構築する予定である。最終的には、家兔眼装用試験も行い、摩擦特性と眼障害発生との因果関係の解明を目指す。

Preliminary study on frictional property of decorative contact lenses

Ryusuke Nakaoka¹, Hiroko Iwashita², Yuichi Hori², Kiyoshi Mabuchi³, Rina Sakai³, Masanubu Ujihira³, Toru Matsunaga⁴, Yuji Haishima¹

¹Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, ²Department of Ophthalmology, School of Medicine, Toho University, ³Clinical Engineering Course, Faculty of Medical Engineering and Technology, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, ⁴Research and Development Department, SEED Co., Ltd.

Tel: +81-44-270-6600 ex.1721, Fax: +81-44-270-6545, E-mail: nakaoka@nihs.go.jp

光誘起型架橋ポリマーによる高分子多孔体の表面機能化

東京大学大学院工学系研究科

○深澤 今日子, Sheng-Han Chen, 石原 一彦

【緒言】高分子多孔体は、医療の分野において、血液から血球成分の分離または病因物質の除去など分離・精製を行う基材として利用されている。近年、様々な多孔化技術が開発され、ナノ～サブミリサイズまで微細構造を制御可能となっている。一方で、多孔体細孔内の表面機能化に関しては、効率的に処理する方法が確立されていないのが現状である。多孔体の表面機能化が簡便にできれば、より高精度でかつ選択的な分離・精製が可能になると期待できる。そこで我々は、多孔体の表面処理方法として、低分子の光活性剤と N-アルキル置換アニリン基の架橋反応を利用したポリマーシステムを考えた。この系では、照射によって光活性剤から発生したラジカルが、ポリマー鎖側鎖の N-アルキル置換アニリン基に連続的に反応し最終的に架橋構造となる。すなわち、照射により細孔内に吸着したポリマーが架橋され、安定なポリマー薄膜層を形成できると考えられる。本研究では、細孔内表面に親水性と防汚特性を付与することを目的とし、2-(N-ethyl-anilino)ethyl methacrylate (PMA) と 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) の共重合体 (PMP) (図 1) を合成した。その際、ランダム型 (PMrP) およびブロック型 (PMBP) のポリマーを合成し、分子構造の違いが特性に及ぼす影響を考察した。表面処理後の親水性および防汚特性評価として、水の接触角およびタンパク質の吸着量を測定した。

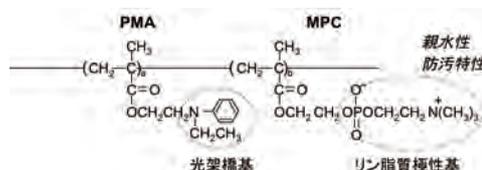


図 1. 光誘起型架橋 MPC ポリマー (PMP) の構造

【実験】光活性剤である tribromoethanol (0.25 wt%) と PMP (0.5 wt%) をエタノールに溶解し、コーティング溶液とした。孔径 20 μm のポリエチレン (PE) 多孔体をコーティング溶液に浸漬し、乾燥後、照射 (254 nm) を 6 分間行った。エタノール溶液中で多孔体を洗浄し、未反応のポリマーを除去した後、各種分析 (XPS, IR 測定) に用いた。また、蛍光分子を含む PMP を合成し、共焦点レーザー顕微鏡にて多孔体の断面を観察した。親水性評価として、多孔体表面での水接触角の時間依存測定を行った。また、防汚特性評価としてフィブリノーゲンの吸着量を MicroBCA 法により決定した。

【結果と考察】表面処理後、XPS および IR 測定で MPC ユニットに由来するピークが検出され、PE 表面が PMP で覆われたことが確認された。また、PMP が溶解するエタノール中で超音波洗浄した後も同様にピークが検出され、PMP が安定に PE 表面に結合していることがわかった。共焦点レーザー顕微鏡では、PE 多孔体の内部にも強い蛍光が確認され、この表面処理方法で細孔内を処理できることが明らかとなった。また、親水性評価として、水接触角の時間依存性を測定した。未処理の PE 表面の水接触角は 120° 以上であり、この高い値は 16 秒間以上維持された。一方、PMrP および PMbP で処理した表面の水接触角はそれぞれ 90° および 58° であり、これらの値は時間と共に減少し、12 秒間以内に 0° となった。すなわち、疎水性の PE 多孔体は PMP の表面処理により親水性となり水を吸着する多孔体となった。また、PMBP で処理後、フィブリノーゲンの吸着量は未処理の PE 基材に比べ 95% 以上減少した。MPC ポリマーは、タンパク質の吸着を抑制することが知られており、その特性が表面処理により PE 多孔体に付与できた。本研究の表面処理方法は、高分子多孔体に任意の機能を付与することが可能であり、新しい分離・精製基材として代謝系医療デバイスなどへの応用が期待できる。

本研究は AMED S-イノベーション「革新的医療を実現するためのバイオ機能材料の創製」によった。

Surface Functionalization of Porous Biomaterials with Photoinduced-crosslinking Polymer System

Kyoko Fukazawa, Shen-Han Chen, Kazuhiko Ishihara

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

Tel: +81-3-5841-7124, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: fukazawa@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

Large-scale preparation of hair follicle germs for hair regenerative medicine

Tatsuto Kageyama^{1,2}, Junji Fukuda^{1,2*}

¹ Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology,

² Faculty of Engineering, Yokohama National University, kageyama-tatsuto-tp@ynu.jp

Regenerative medicine has been increasingly expected as a new approach for the treatment of hair loss. Recent studies have shown that transplantation of a compartmentalized hair follicle germ (HFG), which was fabricated by integrating two respective aggregates of mesenchymal and epithelial cells, led regeneration of hair follicles. This approach is excellent, but one drawback is to require labor steps for the preparation of the germs particularly considering that hundreds of thousands of hair follicles are necessary for a single patient. In this study, we propose a robust approach for a large-scale preparation of HFGs through self-organization of cells. We revealed that when the two types of hair cells, mouse epidermal and mouse/human mesenchymal cells, were mixed in suspension and seeded in a microwell they initially formed a randomly-distributed single cell aggregate but then spatially separated each other and exhibited typical morphological features of HFG in three days of culture. This finding facilitated a large-scale preparation of compartmentalized HFGs (~5,000 HFGs). We fabricated a microwell array culture device with oxygen-permeable silicone (PDMS) and demonstrated that oxygen supply through the bottom of the silicone device was crucial for the spontaneous formation of HFGs (Fig.1A-C). The HFGs efficiently generated hair follicles and hair shafts after intracutaneously transplanted in the back of nude mice (Fig.1D). The regenerated hair follicles also showed the hair cycle through the rearrangement of follicular stem cells. Our preliminary results showed that spontaneous cell separation and HFG formation could be achieved by seeding human keratinocytes and human dermal papilla cells on the chip. This simple HFG preparation approach may provide a promising strategy for advancing hair regenerative medicine.

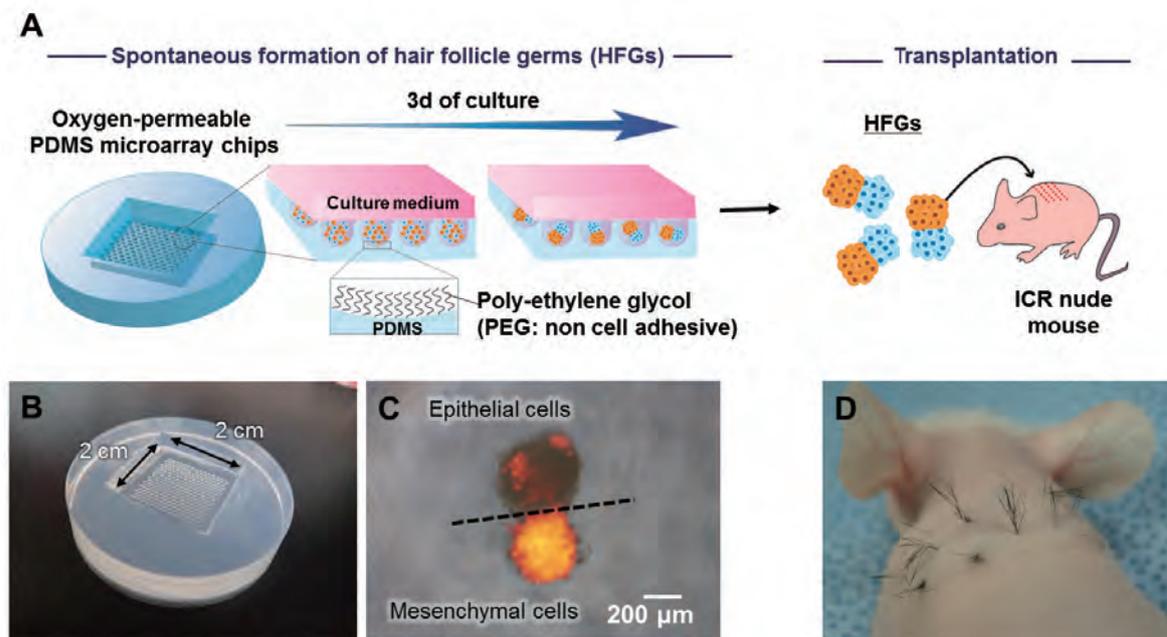


Fig. 1 Large-scale preparation of HFGs. (A) Schematics for spontaneous formation of HFGs and their intracutaneously transplantation. (B) Fabricated oxygen-permeable PDMS microarray chips. (C) Spontaneously formed HFGs at 3 d after seeding. (D) Hair shafts generated from transplanted HFGs.

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL NANOPARTICLES FOR THE DETECTION OF BACTERIA

Yuji Tsuchido^{1,2}, Aya Kitamura¹, Yuna Kasai¹, Hiroyuki Kobayashi¹, Takeshi Hashimoto¹, and Takashi Hayashita^{1*}

¹Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University, ta-hayas@sophia.ac.jp

²Current address: Bioengineering Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN,

Nowadays, there are a lot of patients in hospital with weakened immune systems. Thus, to prevent in-hospital infection caused by pathogenic bacteria is one of the important problems. Also, food poisoning caused by bacteria could threaten the human health, so it is an important problem to provide safety food and water. For the detection of bacteria, 'culture method' is well known as standard conventional method. However, culture method spends a lot of time to detect bacteria, so it might spread infectious diseases. To overcome this disadvantage, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) analyses have been developed in recent years. These methods could achieve comparatively rapid detection of bacteria, but these methods are high cost, require clean room, and require advanced technical knowledge to use.¹⁾ Therefore, many researchers has attracted to develop more rapid and simple method of bacteria detection. In particular, nanoparticle sensors are promising because their surfaces and chemical structures are easily controlled and various types of recognition sites can be introduced on the nanoparticle surface. In addition, the nanoparticles are inexpensive, have low toxicity, and can be easily handed.

Herein, we developed dipicolylamine or boronic acid-modified fluorescent silica nanoparticle (dpa-HCC/FSiNP or B/FSiNP) complex for bacteria detection based on the recognition of phosphate group or saccharide chain on the bacteria surface (Fig. 1). Also, we investigated the interaction between pathogenic bacteria and dpa-HCC/FSiNP or B/FSiNP complex.²⁾

First, dpa-HCC was synthesized by Mannich reaction of dipicolylamine, formamide and 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid. Fluorescent silica nanoparticle contained [Ru(bpy)₃] (FSiNP) was synthesized as reported.³⁾ Then, dpa-HCC or 4-carboxyphenylboronic acid was modified to the surface of FSiNP and obtained dpa-HCC/FSiNP or B/FSiNP complex. We evaluated the recognition function of Cu-dpa-HCC/FSiNP complex for phosphoric acid derivatives (monophosphate, pyrophosphate, triphosphate, ATP) by fluorescent spectroscopy and revealed that strong response for tri phosphoric acid. Also, the response for pathogenic bacteria (*E. coli* and *S. aureus*) was observed by fluorescent microscopy. Both dpa-HCC/FSiNP and B/FSiNP complex and bacteria formed visible aggregates within 10 min. These results indicate that Cu-dpa-HCC/FSiNP and B/FSiNP complex could detect phosphate group or saccharide chain of bacterial surface. In conclusion, we could detect bacteria by forming large aggregation.

1) C.-Y. Wen, J. Hu, Z.-L. Zhang, Z.-Q. Tian, G.-P. Ou, Y.-L. Liao, Y. Li, M. Xie, Z.-Y. Sun, and D.-W. Pang, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 1223-1230.

2) Y. Kasai, H. Kobayashi, Y. Tsuchido, T. Hashimoto, N. Kanzawa, T. Hayashita, *Chem. Lett.*, **2016**, 45, 749-751.

3) X. J. Zhao, L. R. Hilliard, S. J. Mechery, Y. Wang, R. P. Bagwe, S. Jin, W. H. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, 101, 15027-15032.

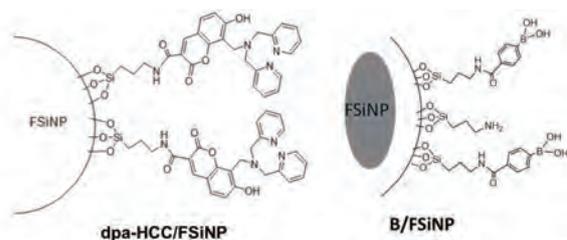


Fig. 1. Schematic representation of dpa-HCC/FSiNP and B/FSiNP complex.

Fabrication of Intracellular ATP-responsive Polyion Complex Micelles for Smart Nucleotide Therapeutics Delivery

Mitsuru Naito¹, Naoto Yoshinaga², Takehiko Ishii², Akira Matsumoto³, Yuji Miyahara³, Kanjiro Miyata², Kazunori Kataoka^{4,5,*}

¹Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, ²Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, ³Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ⁴Policy Alternatives Research Institute, The University of Tokyo, ⁵Innovation Center of NanoMedicine, Kawasaki Institute of Industrial Promotion, kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

Small interfering RNA (siRNA) offers striking therapeutic potential as a molecular-targeted drug, because of its unique ability to down-regulate target mRNA expression. However, siRNA-based therapies have severely limitation to clinical applications, mainly due to its poor bioavailability stemming from susceptibility to enzymatic decomposition and renal filtration as well as inefficient cellular internalization. To overcome these bottlenecks, a great deal of efforts has been focused on fabrication of smart polymeric nanocarriers suitable for delivery of siRNA. Encapsulating siRNA into such nanocarriers has proven to be a feasible approach to improve both the longevity of siRNA in blood stream and the cellular internalization of siRNA with enhanced bioavailability. Nevertheless, there is still much room for improvement in the polymer design to better address a conflicting challenge inherent to this kind of approaches, that is, stable encapsulation of siRNA in the extracellular milieu followed by the prompt release when arriving specifically at cytoplasm of the target cells. One promising approach is a fabrication of polyion complex (PIC) micelles with intracellular-responsive functions, such as disulfide bondings (*Biomaterials* 2014, 35, 7887). However, thiol moieties are sensitive to oxidation and occasionally cause difficulty in the handling and restriction of nanocarrier design. An alternative molecular design for stimuli-responsive siRNA delivery systems is required.

We fabricated a simple but effective molecular design for an intracellular-responsive smart siRNA delivery system (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 10751). The PIC micelles utilize a phenylboronate functionality, which can form reversible ester formation with 1,2-*cis*-diols on the ribose ring at the end of siRNA and thus, PIC micelles turned to be stable at the extracellular condition. Notably, the boronate ester can be exchanged by other competing biomolecules containing 1,2-*cis*-diols, thus providing a molecular basis for 1,2-*cis*-diol-responsive siRNA release. Indeed, we demonstrated adenosine triphosphate (ATP), which also contains 1,2-*cis*-diol moiety, triggered the concentration-dependent release of siRNA encapsulated in the PIC micelles prepared from poly(ethylene glycol)-*block*-poly(L-lysine) (PEG-PLys) bearing 4-carboxy-3-fluorophenylboronic acid (FPBA) moieties in PLys side chains.

Although FPBA-modified PIC micelles (FPBA micelles) opened a new avenue for smart intracellular delivery of siRNA, a comparative study on the polymer structure-function relationship is yet to be elucidated in detail. It is reasonably assumed that the FPBA modification rate must be carefully controlled to balance the stability and the ATP-responsivity of the micelles. Thus, we have further developed the FPBA micelles to improve the gene-silencing capability and the stability of the micelles (*Macromol. Biosci.* 2018, 1, 1700357). We eventually demonstrated the FPBA modification rate in PEG-PLys critically affects its ATP-responsivity and structural durability. The FPBA modification rates of 20–35% were identified with the best performance in both the stability in serum-containing media at the extracellular concentration of ATP and the destabilization for the siRNA release at the intracellular level of ATP, leading to the significant RNAi activity. Recently, we have successfully developed the phenylboronate-based ATP-responsive PIC micelles for gene and messenger RNA delivery systems (*J. Am. Chem. Soc.* 2018, 139, 18567).

This is the first study to demonstrate the intracellular-ATP-responsiveness with synthetic polymers. Because of its quite simple chemistry; just conjugating phenylboronic acid moieties into polymers, this strategy can be easily diverted into other biomaterial applications. Indeed, we have already demonstrated the effective siRNA, DNA and mRNA delivery with this strategy. We strongly believe that the phenylboronic acid-based ATP-responsive system provide a completely new directions in biomaterial fields.

