

PEG 脂質による血管内皮のコーティングと腎移植における虚血再灌流障害の保護効果

¹ 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻, ²Uppsala University, Department of Immunology, Genetics and Pathology, ³Lund University Hospital Department of Transplantation, ⁴Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences

○寺村裕治^{1,2}, Sana Asif², Alireza Biglarnia³, Kristina Nilsson-Ekdahl², Marianne Jensen-Waern⁴, Bo Nilsson²

【緒言】 末期腎不全の患者への腎臓移植は有効な治療法であり、脳死ドナーのみならず生体ドナーを利用できるため、移植医療として定着しつつある。しかしながら、移植直後に起きる虚血再灌流障害などが原因で生着率は未だ低く、移植後の腎臓が機能不全に陥ってしまうことが問題である。我々は、これまでにポリエチレングリコール結合脂質（PEG 脂質）による表面修飾剤を利用して細胞をコーティングすることで、移植直後に起きる補体系や凝固系の活性化が引き起こす細胞傷害反応から細胞を保護できることを実証してきた。本研究では、PEG 脂質による細胞コーティング技術を腎臓内の血管内皮細胞へ適用し、ブタ腎臓移植モデルを用いて、腎臓移植後の免疫系や凝固系の活性化反応を調べ、表面修飾による保護効果について詳細に調べた。

【実験】 ドナーとしてブタ（30-35kg）から腎臓を摘出し、24 時間低温保存を行う。移植直前に、PEG 脂質溶液を血管から腎臓全体へ注入し、30 分間反応させた。洗浄後、レシピエントのブタへ腎臓移植を行った。ここでは、レシピエントへ腎臓を移植した後、6 時間麻酔下にて経過観察を行った。ドナーから摘出した 2 つの腎臓をそのままレシピエントへ移植し、レシピエントの腎臓を取り出さないモデルを利用した。ここでは、移植前に片側の腎臓のみを PEG 脂質で処理することで、一つのレシピエントにおいて PEG 脂質で処理した腎臓と無処理のコントロールの腎臓の両方を有するレシピエントになっている。腎臓内の PEG 脂質の修飾分布状態を調べるために、ビオチン化 PEG 脂質を使用した。移植後の腎臓の生検を行い、凍結切片から FITC-streptavidin で染色した。腎機能は、移植後 6 時間に排出された全尿量から評価した。また、経時的に採血のサンプリングを行い、凝固系マーカー（トロンビン・アンチトロンビン複合体(TAT)）と補体系マーカー（C3a, sC5b-9）を ELISA にて測定した。また、移植後の腎臓の生検を行い、免疫組織化学的検査を行った。本実験で移植したレシピエントのブタには、免疫抑制剤の投与を行っていない。

【結果と考察】 腎臓の血管から PEG 脂質を注入し、腎臓内の血管内皮細胞表面のコーティングを試みた。腎臓の生検の切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察したところ、全ての腎臓部位の血管内皮細胞の表面から蛍光が観察された。コントロールとして FITC-streptavidin を腎臓切片に処理しただけでは、蛍光が見られない。このことから、血管から注入された PEG 脂質は、疎水性相互作用により、腎臓内の血管内皮細胞の表面に導入できることが分かった。移植後 6 時間に排出された全尿量を比較したところ、PEG 脂質で処理した腎臓を移植した全尿量は、無処理の腎臓よりも多いことが分かった。このことは、PEG 脂質による表面処理を行うことで、移植直後の腎機能が向上されていることを示唆する結果である。また、移植後 6 時間では、TAT、C3a、sC5b-9 ともに、PEG 脂質で処理した腎臓を移植したグループの方が、低い値を示した。組織切片の病理学検査からも、補体系マーカー（C5aR, C3b）の沈着は少なかった。このことから、PEG 脂質による腎臓血管内皮の表面修飾により、移植直後における凝固系や補体系の活性を抑制できることがわかり、腎機能を改善できることが分かった。

Protective effect of cell surface modification of endothelium with PEG-lipid on ischemia-reperfusion injury in pig kidney transplantation

Yuji TERAMURA^{1, 2}, Sana ASIF², Alireza BIGLARNIA³, Kristina NILSSON-EKDAHL², Marianne JENSEN-WAERN⁴, Bo NILSSON²

Department of Bioengineering, The University of Tokyo, ²Uppsala University, Department of Immunology, Genetics and Pathology, ³Lund University Hospital Department of Transplantation, ⁴Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences

Tel: +81-03-5841-1174, E-mail: teramura@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

スフェロイド形成可能な表面物性と構造を有するナノシートの調製

¹早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻, ²早稲田大学高等研究所, ³JST さきがけ
○末松 良隆¹, 武岡 真司¹, 藤枝 俊宣^{2,3}

【緒言】スフェロイド(球状細胞組織体)は細胞の三次元相互作用により二次元培養系よりも生体内の細胞環境に近い機能を発現すると期待されており、これまで *in vitro* においてドラッグスクリーニングや生体組織の機能評価に利用されてきた。近年、疾患治療を目的としたスフェロイド移植に関する研究が注目される一方で、スフェロイドの作製技術や移植方法は途上段階にある。そのため、高い分化効率に寄与する均一なスフェロイドの作製法や移植に適した新たな再生医療基材の開発が期待されている。本研究では、スフェロイドを培養・維持する移植可能な基材として高い柔軟性と密着性を有する自己支持性高分子超薄膜(ナノシート)に着目し、表面微細構造を有するナノシート上での脂肪由来幹細胞(ASCs)スフェロイドの作製方法について検討したので報告する。具体的には、多孔質ナノシートおよび平滑ナノシート表面におけるスフェロイドの形成様式をスフェロイドの接着形態およびサイズと数から比較し、スフェロイドからの繊維芽細胞増殖因子(FGF-2)の分泌能を評価した。

【実験】PDLLA($M_w=300,000-600,000$)とポリスチレン(PS, $M_w\approx 280,000$)からなる相分離ナノシート(各 10 mg/ml)をグラビアコート法にて製膜し、シクロヘキサンにより PS 領域を選択的に除去することで多孔質ナノシートを作製した¹。対照群として表面に格子状の微細構造を有する NanoCulture Dish™(JSR Corp. 幅 1 μm , 間隔 3 μm , 深さ 1 μm)、平滑なナノシート(膜厚 140 nm)、ガラスベースディッシュ(IWAKI)を用いた。ASCs をそれぞれの基材に播種(2.0×10^5 cells/ $\phi 35\text{mm}$ dish)し、1, 2, 3 日目の細胞形態を経時的に観察した。細胞固定後、凍結乾燥し走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。また、PhalloidinにてF-アクチンを染色し、倒立型共焦点顕微鏡により細胞接着形態を観察した。形成された細胞凝集体の画像からサイズと数を解析した。次いで、繊維芽細胞成長因子(FGF-2)の分泌を免疫染色にて蛍光観察し、ELISA 法および qRT-PCR 法により FGF-2 の分泌量および mRNA の発現量を定量した。

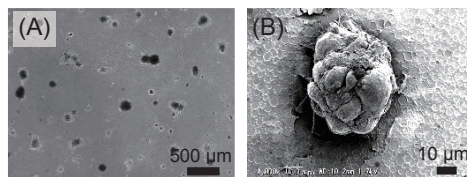


Figure 1 (A) ASCs morphology on porous nanosheet, (B) SEM image of spheroid cultured on porous nanosheet.

【結果と考察】作製した多孔質ナノシート表面を AFM にて観察した結果、シートを貫通する孔の形成が観察された(膜厚 140 nm, 孔径 4 μm)。各基材上に ASCs を播種し細胞形態の経時変化を観察した結果、NanoCulture Dish™ および両シート群において基材上に細胞凝集体の形成が認められた(Fig. 1A)。平滑ナノシート上でも細胞凝集体が形成されたのは、PDLLA の有する細胞低接着性によるものと考えられる。各基材上で作製した細胞凝集体の接着様式および大きさを比較したところ、NanoCulture Dish™ に比べて平滑ナノシートと多孔質ナノシート上では細胞凝集体の接着に寄与する二次元接着細胞が多く認められ(Fig. 1B)、NanoCulture Dish™ と類似のサイズと分布を示した(直径 約 70 μm)。これは、NanoCulture Dish™ の格子構造が細胞接着を抑制するためであり、基材への細胞接着性が細胞凝集体の安定な保持に寄与することが示唆された。さらに、多孔質ナノシート上で作製した細胞凝集体の FGF-2 分泌能を評価したところ、ガラスベースディッシュ上の二次元接着細胞群に比べて 10 倍以上の FGF-2 の分泌および mRNA の発現が認められた。

【文献】1. Suzuki S, Nishiwaki K, Takeoka S, Fujie T, *Adv. Mater. Technol.*, **1**(6), 1600064 (2016).

Preparation of physically and structurally-tailored nanosheets for engineering spheroids

Yoshitaka Suematsu¹, Shinji Takeoka¹, Toshinori Fujie^{2,3}

¹Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, ²Waseda Institute for Advanced Study, Waseda University, ³Japan Science and Technology Agency, PRESTO

Tel: +81-3-5369-7324, Fax: +81-3-5369-7324, E-mail: suematsu11395@toki.waseda.jp

新規人工真皮の承認及び今後の展望

関西医科大学形成外科学講座

○森本 尚樹、Maria Chiara Munisso, Sharon Claudia Notodihardjo, Tien Minh Le、光井 俊人、覚道 奈津子、楠本 健司

【緒言】

コラーゲンスポンジとシリコーンシートの二層性構造を持つ人工皮膚（二層性人工真皮）は1990年代に承認され現在も全層皮膚欠損創に対する標準治療として臨床現場で使用されている。我々は従来の二層性人工真皮を改良し、アルカリ処理ゼラチンを組み込むことで塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF: フィブラストスプレー[®]) を保持・徐放可能な新規人工真皮考案し開発を行ってきた。新規人工真皮は1週間以上 bFGF の保持が可能で、健常マウス、糖尿病マウス、白色家兎、ビーグル犬を用いた非臨床研究、及び難治性皮膚潰瘍を対象とした医師主導治験で創傷治癒促進効果があることが確認され、2018年4月に新規医療機器（ペルナック G プラス[®]、ゲンゼ（株））として製造承認を受けた。新規人工真皮は bFGF を静電的に吸着・保持し、スポンジの分解と共に bFGF を放出することを確認している。しかし、放出される bFGF の生理活性について *in vitro* では検討ができていなかったため、今回検討を行った。

【実験】

新規人工真皮に bFGF を含浸し、37°C で 1、3、5、7、14 日間インキュベートした後に、コラゲナーゼを用いてスポンジを分解した。また、スポンジに含浸させないままの bFGF 溶液も同様に 37°C でインキュベートした。スポンジを分解後回収された bFGF とインキュベートのみ行った bFGF の生理活性を、これらの bFGF を添加した DMED 培地を用いてヒト線維芽細胞を培養し、細胞増殖の有無から評価した。また、bFGF を含浸させたスポンジ上に線維芽細胞を播種し、細胞の増殖を確認した。

【結果と考察】

この結果、人工真皮に吸着していた bFGF が7日間インキュベートしても細胞増殖効果があったのに対し、bFGF 溶液は数日で増殖効果がなくなっていた。また、bFGF を含浸させたスポンジ上では細胞が増殖することが確認できた。以上から、スポンジに吸着された bFGF は 37°C インキュベートしても生理活性失わずに保持していることが明らかとなった。新規人工真皮は bFGF 以外にも PDGF、TGF- β などの細胞成長因子も保持可能であることを確認している。また我々の臨床研究結果から、自家線維芽細胞を播種培養した人工真皮と bFGF 含浸新規人工真皮には同等の創傷治癒効果があることも示唆されている。新規人工真皮は従来の人工真皮よりも bFGF を併用した場合の血管新生効果が高く、加えて bFGF を単独使用する時よりも生理活性を保持する効果があることが確認され、皮膚全層欠損、皮膚難治性潰瘍治療の有用な治療法となることが改めて確認された。今後、海外より細胞を含む創傷被覆材あるいは生体由来材料を加工した創傷被覆材が導入されると予想されるが、これらに対しても新規人工真皮は十分対抗できる創傷治癒効果があると考えている。

The approval of a novel artificial dermis and its further development

Naoki Morimoto, Maria Chiara Munisso, Sharon Claudia Notodihardjo, Tien Minh Le, Toshihito Mitsui, Natsuko Kakudo, Kenji Kusumoto

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University

Tel: +81-72-804-0101, Fax: +81-72-804-2031, E-mail: morimotn@hirakata.kmu.ac.jp

フィブリンゲルを用いたヒト骨格筋組織の機能化と継続的な収縮運動による成熟化

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所
○高橋 宏信, 清水 達也, 大和 雅之, 岡野 光夫

【緒言】

再生医療の実現に向けた組織工学技術の発展に伴い、様々な組織を構築することが可能となってきた。温度応答性基材で培養した細胞シートを積層することにより、スキャホールドフリーで細胞を高密度に集積させた組織を作製することも可能になっている。一方、可能な限り生体に近い構造・機能を有する組織を再現するための技術は更なる発展が求められている。生体の骨格筋組織は筋線維が同一方向に配向した構造を有していることから、生体模倣の観点において組織の配向構造を再現する必要がある。これまでの研究において、高分子パターンニング技術によって表面修飾した温度応答性培養基材を用いて配向した骨格筋細胞シートを作製することに成功している。本研究では、この技術を基盤として、さらに機能的な骨格筋組織の構築を実現するための培養手法の確立を試みた。

【実験】

温度応答性基材表面に部位選択的にポリアクリアミドをグラフトすることで2種類のポリマーがストライプ状に形成されたパターン化温度応答性基材を作製した。筋芽細胞をこの基材に播種してコンフルエント状態になるまで培養した後、培養温度を20°Cにすることで細胞シートとして回収した。これをフィブリンゲル上に転写した後、筋管分化を誘導するために分化誘導培地で培養した。筋組織の分化に関しては、筋芽細胞の形状変化および筋細胞特異的なタンパク質の発現から評価を行った。さらに、電気刺激(10 V, 1-15 Hz)による筋収縮挙動およびリアノジン添加による筋収縮への影響について観察し、作製した筋組織の機能評価を行った。また、継続的に電気刺激(1時間刺激(10 V, 1 Hz) + 3時間休止)を与えることにより骨格筋組織に運動負荷を与え、組織の成熟を促進する効果について検証した。

【結果と考察】

パターン化基材に播種した筋芽細胞は同一方向に配向し、低温培養することにより細胞シートとして回収できた。作製した細胞シートは配向構造を維持した状態のままフィブリンゲル上に転写することが可能であった。さらに分化誘導3週間後、ゲル上に配向した筋管組織が形成されており、それらが筋収縮を引き起こすサルコメア構造を有していることも確認できた。次に、作製した筋組織を電氣的に刺激したところ、電気刺激にตอบสนองして筋組織が収縮する様子を観察することができた。刺激条件が1 Hzの場合、筋組織は単収縮するのに対し、15 Hzで刺激すると強縮する様子が確認され、生体の骨格筋と同様の生理的特性を持つことが明らかになった。さらに、培地中にリアノジンを添加したところ、電気刺激下においても筋収縮が抑制される様子が観察された。リアノジンの生理活性としては、筋小胞体に存在するレセプターに結合することでカルシウムイオンを細胞質内に放出することが知られており、本実験においても同様の作用機序により筋収縮が抑制されたと考えられる。この抑制効果がリアノジンの濃度に依存的であることから、作製した骨格筋組織が生理的な薬剤応答性を持つ可能性が示唆された。さらに、分化誘導1週間後から2週間にわたり電気刺激を継続的に与えた結果、より大きな筋収縮が見られるようになったことから、筋組織の成熟化を促進する効果があることが分かった。以上の結果から、本手法により作製した筋組織は構造的にも機能的にも生体を模倣していると考えられ、優れた組織モデルとして創薬開発などに今後応用できると期待される。

Functionalization of Human Muscle Tissue Constructs by Culture on a Fibrin Gel and Their Maturation Induced by Continuous Electrical Stimulation

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano

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

Tel: +81-03-3353-8112, E-mail: takahashi.hironobu@twmu.ac.jp

フィブリン糊被覆脱細胞化心膜による心臓-胸壁間の癒着防止

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

○根岸 淳¹, 橋本 良秀², 張 永巍², 山下 暁立², 船本 誠一^{2,3}, 岸田 晶夫²

【緒言】外科手術において、術後癒着による痛みや再手術の煩雑化が問題となっており、様々な癒着防止剤や癒着防止膜が使用されている。心臓血管領域は、先天性心疾患患者の成長に合わせた再手術など複数回手術が多い分野であり、心臓周辺の癒着防止が必要である。しかし、心臓血管手術後の癒着防止において、高い癒着防止効果を示す材料は開発されていない。

本研究では、高い生体適合性を有する脱細胞化心膜と癒着防止効果を有するフィブリン糊を組み合わせた新規癒着防止膜を検討した。心臓血管手術後に、患者心膜と縫合可能で、さらに、材料表面に細胞接着することで癒着防止機能が持続する材料の基盤開発を目指した。

【実験】高静水圧法により、ブタ、ウシ心膜を脱細胞化、凍結乾燥して凍結乾燥脱細胞化心膜を作製した。凍結乾燥脱細胞化心膜をフィブリノゲン溶液に浸漬、その後、トロンビン溶液に浸漬することでフィブリン糊被覆脱細胞化心膜を作製した。また、コントロールとして、凍結乾燥脱細胞化心膜を生理食塩水で還元した生理食塩水還元脱細胞化心膜を使用した。

細胞試験として、フィブリン糊被覆脱細胞化心膜、生理食塩水還元脱細胞化心膜とフィブリン糊表面への細胞接着試験を実施した。動物試験として、麻酔下の動物の心膜を除去、心臓表面を擦過して癒着を惹起したラットおよびウサギ心臓癒着モデルを用いて癒着防止評価を行った。ラット試験では、擦過した心臓表面にフィブリン糊被覆脱細胞化心膜、生理食塩水還元脱細胞化心膜を縫合しないで設置した。また、コントロールとして未処置群とフィブリン糊塗布群を作製した。ウサギ試験では、心臓擦過後、ウサギ心膜とフィブリン糊被覆脱細胞化心膜、生理食塩水還元脱細胞化心膜を縫合した。一定期間経過後、心臓と脱細胞化心膜間、または心臓と胸壁間の癒着度を所見評価し、組織学的染色及び免疫染色により細胞接着を評価した。

【結果と考察】フィブリン糊被覆脱細胞化心膜の組織学的染色により、脱細胞化心膜の表面にフィブリン糊が接着していることが明らかになった。細胞接着試験では、生理食塩水還元脱細胞化心膜と比較し、フィブリン糊とフィブリン糊被覆脱細胞化心膜への接着細胞数が少なかった。

ラット心臓接着モデルにおいて、未処置群、フィブリン糊塗布群では心臓表面と胸壁の強硬な癒着が認められ、生理食塩水還元脱細胞化心膜群では脱細胞化心膜と心臓の癒着が生じた。一方、フィブリン糊被覆脱細胞化心膜群では心臓表面と脱細胞化心膜の癒着はほとんど認められなかった。また、染色評価から、生理食塩水還元脱細胞化心膜には中皮細胞の接着は認められず、それ以外の線維芽細胞などの集積が認められ、フィブリン糊被覆脱細胞化心膜には表面の中皮細胞接着が認められた。また、ウサギ心臓癒着モデルにおいて、脱細胞化心膜はウサギ心膜と縫合可能であり、ラットモデルと同様、フィブリン糊被覆脱細胞化心膜の癒着防止効果が認められた。

以上から、フィブリン糊被覆脱細胞化心膜では、初期炎症による癒着形成をフィブリン糊が防止し、その後、脱細胞化心膜表面を中皮細胞が被覆することで、癒着防止効果が持続する可能性が示唆された。

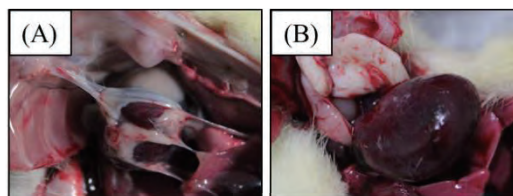


Figure 1. (A) Saline/pericardium and (B) saline/fibrin in rat models.

Postoperative Pericardial Adhesion Prevention by Fibrin-coated Decellularized Pericardia in Animal Models

Jun NEGISHI¹, Yoshihide HASHIMOTO², Yongwei ZHANG², Akitatsu YAMASHITA², Seiichi FUNAMOTO^{2,3}, Akio KISHIDA²

¹Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

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

³International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science

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

消化器ガン治療を指向した多機能性創傷治癒粒子の創出

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】

内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）は、食道や胃、大腸などの消化器における早期消化器ガンを内視鏡によって切除する低侵襲な治療法として注目を集めている。一方で、がん組織を含む粘膜下層剥離後、組織剥離部位で生じる収縮（瘢痕拘縮）による狭窄が深刻な課題となっている。術部の炎症を抑制し創傷治癒を促進することを目的として、創傷被覆材が臨床で使用されているが、組織接着性が低い点、生体吸収性が乏しい点、分解に伴う炎症が生じる点、創傷部への送達が難しい点などの課題がある。

そこで本研究では、消化器がん術部の創傷治癒を促進する多機能性粒子を創出することを目的とする（Figure 1a）。生体高分子であるゼラチンに疎水基を導入した疎水化ゼラチンからなるマイクロ粒子を調製し、それらの生体組織に対する接着性、血液凝固能、再上皮化能を評価し、ラット皮膚全層欠損モデルを用いて創傷治癒効果を評価した。

【実験】

ブタゼラチン（Mw=100 kDa）を脂肪族アルデヒド（C2～C12）と2-ピコリンボラン存在中で反応させることで、種々の導入率の疎水化ゼラチンを合成した⁽¹⁾。得られた疎水化ゼラチンを水・エタノール混合溶媒に溶解し、スプレードライ法によってマイクロメートルサイズの粒子を作製した。得られたゼラチン粒子を減圧下、150 °C で3時間熱架橋することによって、疎水化ゼラチンマイクロ粒子を調製した。炭素鎖長または導入率の異なる種々の疎水化ゼラチン微粒子の表面特性は接触角測定によって評価した。更に、生体組織としてブタ胃内壁を用い、疎水化ゼラチン粒子の接着試験を ASTM F-2258-05 に従って評価した。

【結果と考察】

疎水化反応およびスプレードライ法によって疎水化ゼラチン粒子が作製可能であった（Figure 1b）。導入する疎水基の鎖長によって疎水化率が制御可能であり、ブタ胃粘膜下層組織に対して高い接着性を有することが明らかとなった（Figure 1c,d）。C8を修飾した疎水化ゼラチン粒子（C8）は、何も塗布しない場合の10倍、未修飾ゼラチン粒子（Org）の2倍の接着強度を示した。これは、粒子表面に露出した疎水基が細胞や細胞外マトリックス成分と相互作用したためであると考えられる。

また、疎水化ゼラチン粒子は、血液成分との疎水性相互作用によって血液凝固を促進し、さらに、上皮細胞培養実験において疎水化ゼラチン粒子が増殖能を高めた。ラット皮膚全層欠損モデルにおいては、疎水化ゼラチン粒子は有意に線維化を抑制し、瘢痕拘縮を抑制することが示唆された。さらに本粒子は、これまでの報告と同様、血管新生を促進することが示された⁽²⁾。開発した噴霧型被覆材は、乾式で内視鏡下により容易に術部へ噴霧可能であり、ESD後の創傷治癒を促進する被覆材として有用であると期待される。

(1) Y. Mizuno, R. Mizuta, M. Hashizume, T. Taguchi, *Biomaterials Science*, **5**, 982-989 (2017).

(2) K. Yoshizawa, R. Mizuta, T. Taguchi, *Biomaterials*, **63**, 14-23 (2015).

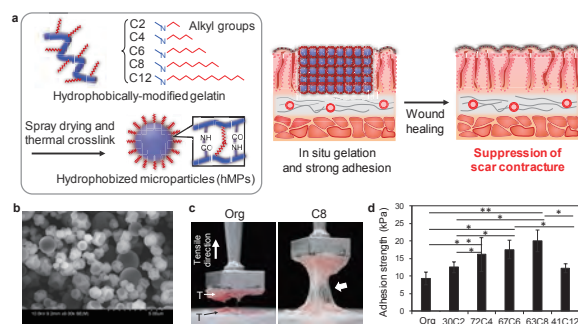


Figure 1. (a) Schematic of colloidal wound dressing composed of hydrophobically-modified gelatin particles. (b) Scanning electron microscopic image of gelatin particles. (c,d) Adhesion test of gelatin particles to gastric submucosa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n = 4$).

Development of multifunctional wound healing particles toward digestive system cancer therapy

Akihiro Nishiguchi¹, Tetsushi Taguchi¹

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

Tel: +81-29-860-4987, E-mail: TAGUCHI.Tetsushi@nims.go.jp

大型実験動物における血液の凝固特性の違いについて

国立循環器病研究センター研究所 人工臓器部
○水野 敏秀, 築谷 朋典, 武輪 能明, 巽 英介

【緒言】

人工心臓などの医療機器を開発する際には、ヒトでの臨床使用を行う前に機器の安全性や有効性を評価する目的で大動物を用いた使用模擬試験が行われている。これらの試験には、一般的には数種の家畜動物が用いられることが多いが、一方で、これら試験より得られた結果のヒトへの外挿性については、解釈が難しい点が多いことも事実である。我々は、これらまで当部で実施してきた数々の動物実験とその後の臨床試験の結果を考察し、医療機器開発時の動物実験における種間の差異を理解することは重要な点だと考えている。本試験では、家畜を使用した動物モデルにおいて、血液凝固に関する各種パラメータが、ヒトとどのように異なるかを比較検討することを目的とした。

【実験】

本研究では、ヒト (n=13)、ウシ (n=18)、ヤギ (n=56)、およびブタ (n=8) より採取した新鮮血を使用し、各動物における凝固パラメータについて比較を実施した。血液凝固の特性については、トロンボエラストメトリー法 (ROTEM, Tem international GmbH, Germany) を用い、外因系凝固系 (EXTEM) および内因系凝固系 (INTEM) の各凝固パラメータを測定した。

【結果と考察】

各動物の血液凝固の特性は、ウシにおいて、外因系凝固および内因系凝固の血液凝固開始時間 (CT, 249.9 ± 91.3 sec, 376.4 ± 124.4 sec) がヒトの CT に比較し明らかに延長していることが示された (63.5 ± 11.8 sec, 192.5 ± 29.0 sec, $p < 0.01$)。また、血液凝固後のクロットの最大の堅さを示す MCF では、家畜動物 (EXTEM: 77-87 mm, INTEM: 66-78 mm) ではいずれもヒトの MCF よりも高値を示し (EXTEM: 59.1 ± 6.0 mm, INTEM: 58.8 ± 1.5 mm, $p < 0.01$)、その最大の堅さになるまでの時間 (MCFt) は、ウシとヤギがヒトやブタと比較し延長する傾向にあった ($p < 0.01$)。

これらの結果より、トロンボエラストメトリー法による血液凝固特性は、ヒトと比較し、家畜では CT, MCF, MCFt が高値を示し、血液凝固の特性には動物種間において異なることが明らかにされた。これら種間の差は特に外因系凝固について顕著であり、家畜動物を用いた動物実験では、組織因子など外因系因子の影響が試験の結果に大きな影響を及ぼすと考えられた。

Differences in clotting parameters between animals for preclinical study

Toshihide MIZUNO, Tomonori TSUKIYA, Yoshiaki TAKEWA, Eisuke, TATSUMI

Department of Artificial Organs, National cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

Tel: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5406, E-mail: toshi@ncvc.go.jp

生体適合性ポリマーと中間水の構造、運動性の相関

¹東レリサーチセンター

○中田 克¹

【緒言】

ポリビニルピロリドン(PVP)やポリエチレングリコール(PEG)は良好な生体適合性ポリマーとして知られている。近年、生体適合性を発現する重要因子として“中間水”が注目されており、PVPやPEGも中間水を有するポリマーである。中間水はさまざまな生体適合性ポリマーにおいて存在することが知られているが、中間水がどのようにして生体適合性を発現しているかは未解明の課題である。一般的に中間水はDSCの昇温過程において、0℃よりも低温で融解する水として分類される水であり、DSCの融解ピーク面積から算出される中間水量が主な分析対象となっている。中間水やそれに基づく生体適合性発現メカニズムを本質的に理解し、生体適合性を制御するためには、中間水の構造や運動性、ポリマーとの相互作用について評価することが重要である。中間水の構造や運動性は、吸着したポリマーの高次構造や運動性の影響も受けるはずであり、同種ポリマーにおいても分子量が異なることで、どのように中間水の構造や運動性の特徴が異なるか調べることは興味深い。

本研究では、分子量違いのPVPとPEG水溶液について、DSC、NMRおよびXRDを用いて、ポリマーや中間水の構造および運動性を調べた。

【実験】

PVP粉末($M_w = 4,000$ と $29,000$)とPEG($1,000$ と $3,350$)を 110°C で真空乾燥した絶乾試料に、水を重量比で混合し試料を調製した。調製した含水率は、それぞれ10、30、50、70、90 wt%である。DSCでは -70°C まで試料を冷却した後、 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温し、昇温過程の融解挙動を観測し、融点および融解ピーク面積を評価した。XRDは -70°C から 20°C の温度範囲で測定を行い、ポリマーと水の回折ピーク位置から高次構造を評価した。NMRは ^1H 核のパルスNMRを用い、XRDと同様に -70°C から 20°C の温度範囲で緩和時間測定を行い、緩和時間が短い(低運動性)成分をポリマー、長い(高運動性)成分を水由来の緩和時間として評価した。各手法から求めた構造や運動性パラメータのポリマー種、分子量、および濃度や温度依存性を調べた。

【結果と考察】

DSC測定の結果、PVPおよびPEGの分子量が異なっても、その融解や融解ピーク面積は分子量間で顕著な差異はないことがわかった。一方で、水の低温結晶化ピークは分子量によって大きく異なっており、これからポリマーや中間水の運動性は異なっていることが示唆される。

さらにPEGのDSC曲線において、二つの融解ピークが観測された。低温のXRD測定でPEG水溶液では氷由来の回折ピークだけでなく、PEGの結晶由来の回折ピークが観測された。この結果から、PEG水溶液のDSC測定で観測された低温側の融解ピークは、PEGの結晶融解に伴う吸熱であることが確認された。PEGの分子量が大きくなると、PEGの融解温度が高温シフトしており、PEGの結晶サイズや水とのマイクロ相分離構造で分子量の違いによる差異が生じていると考えられる。

当日はDSCから求めた水やポリマーの相図を基に、XRDから評価した水やポリマーの高次構造、パルスNMRから評価した水とポリマーの運動性を系統的に比較、議論した結果を報告する。このようなPVPおよびPEGにおけるポリマーの高次構造、運動性が、どのように中間水の構造、運動性に影響を与えるか検証することで、中間水制御による生体適合性についてポリマー選択の判断基準を与えると期待する。

Structural and Dynamic Relation between Biocompatible Polymer and intermediate Water

Masaru Nakada¹

¹Toray Research Center, Inc.

Tel: +81-77-533-8608, Fax: +81-77-533-8696, E-mail: masaru_nakada@trc.toray.co.jp

生体吸収性・操作性・骨再生促進機能を有する新規骨髄止血材料の開発

¹名古屋大学大学院医学系研究科 心臓外科, ³名古屋大学大学院創薬科学研究科 細胞分子情報学分野³, 物質・材料研究機構 MANA メカノバイオロジーグループ

○緒方 藍歌¹, 大野 司¹, 成田 裕司¹, 蟹江 慧², 加藤 竜司², 宇都 甲一郎³, 荏原 充宏³

【緒言】心臓手術の胸骨正中切開など骨切開を伴う手術では骨切断面から多くの出血を伴うため、bone wax で骨切断面にパッキングすることによる物理的な止血法が用いられる。しかし、bone wax は非分解吸収性であるため、残存による骨再生障害や術後感染等の合併症を助長する可能性が指摘されており、最近では胸骨切断面への適応は推奨しないとの報告がある。従って、生体適合性のある新たな骨髄止血材料の開発が望まれる。本研究では、物理的止血が可能な生体吸収性ポリマーに早期骨再生を促す機能性ペプチドを組み合わせた新たな止血材料を開発し、動物実験にて評価を行った。

【実験】ポリカプロラクトン(PCL)誘導体、ポリ乳酸(PDLLA)およびハイドロキシアパタイト(Hap)の複合化により、bone wax に似た粘弾性を有する PCL-based biodegradable polymer (PBP)を作成した。一方、早期骨再生を促す機能性ペプチドには、すでに報告した骨形成促進短鎖ペプチド TLVNSVNSK を用い、PBP に混合した (Osteogenic-Enhancing Short Peptides PBP; pep-PBP)。

ウサギ脛骨骨欠損(2mmφ)モデルを作成し、bone wax、PBP または pep-PBP にして止血したのち、出血量を測定した。Control には sham を用いた。2, 16 週後に CT 撮影、力学的強度測定を行った。

ウサギ胸骨正中切開モデルを作製し、bone wax、PBP、pep-PBP にて止血し閉胸した。Control には sham を用いた。2 週後に胸骨を採取し HE 染色にて組織学的評価を行った。

【結果と考察】脛骨骨欠損モデル：PBP および pep-PBP は、bone wax と同様の操作で止血することができた。出血量は、sham 群 0.61g に対し PBP 群、pep-PBP 群、bone wax 群はそれぞれ 0.02g と顕著に低減し、PBP 群、pep-PBP 群、bone wax 群の間で差はなかった。2 週後において、力学的試験では、pep-PBP 群が bone wax 群に比べ有意に強度が増していた (354.6 vs 203.6 N, p=0.007)。また、pep-PBP 群と bone wax 群では、CT 画像から算出した仮骨形成面積は力学的強度と相関していた (38941.2 vs 11917.3 pixels, r=0.623, p=0.028)。16 週後では、bone wax 群では骨欠損したままだったのに対し、PBP 群および pep-PBP 群では骨再生を促進した。

胸骨正中切開モデル：全ての群で部分的に繊維性細胞の遊走や炎症性細胞の浸潤、および内軟骨性骨化様の所見がみられた。bone wax 群は骨髄腔内が空疎で多くの炎症性細胞浸潤を認めた。一方、PBP 群では残存ポリマー塊が存在していた。pep-PBP 群では残存ポリマーが分散し、均一に細胞が遊走している所見が見られた。

PBP および pep-PBP は bone wax と同程度の止血効果を有し、pep-PBP は早期骨再生を促進したことから、bone wax にとって代わる新たな骨髄止血材料としての可能性を示した。

A biodegradable polymer, combined an osteogenic enhancing short peptide for the new bone hemostatic material

Aika Yamawaki-Ogata¹, Tsukasa Ohno¹, Yuji Narita¹, Kei Kanie², Ryuji, Kato², Koichiro Uto³, Mitsuhiro Ebara³

¹Department of Cardiac Surgery, Graduate School of Medicine, Nagoya University

²Department of Basic Medicinal Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University

³Mechanobiology Group, WPI Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

Tel: +81-52-744-2424, Fax: +81-52-744-2383, E-mail: aika@med.nagoya-u.ac.jp

経内視鏡的に導入可能なコラーゲングルによる胃穿孔の閉鎖と治癒

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群馬大学大学院医学研究科 消化器・肝臓内科学

○柚木 俊二¹, 成田 武文¹, 浦岡 俊夫²

【緒言】 内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) による早期癌治療では, 偶発症の 1 つである穿孔の発症が問題となっている。穿孔は内視鏡用クリップによって閉鎖され得るが, 穿孔を生じた不安定な治療環境の下, サイズ 1cm 未満のクリップを用いた内視鏡的処置には高度な技術を要する。この臨床課題を解決するため, 発表者らは「経内視鏡的に使用可能な吸収性コラーゲングル (ICG)」を開発し, シリンジからカテーテル経由で導入した ICG で穿孔を閉鎖できることをブタ急性実験にて実証した (第 38 回日本バイオマテリアル学会)。本発表では, ブタ胃穿孔部の治癒および ICG の吸収を慢性実験により評価するとともに, 潰瘍底への ICG の付着形態を評価したので報告する。

【実験】 1. ICG の調製 224 mM の塩化ナトリウムおよび 4 mM のゲニピンを含有した 2.4% の中性コラーゲンゾルを, 濃縮コラーゲン溶液, ゲニピン水溶液, および塩化ナトリウム含有リン酸緩衝液を攪拌・混合して調製した。 2. ブタ胃穿孔の閉鎖実験 全身麻酔したブタの胃に対して仮想 ESD を実施して潰瘍を作製し, 潰瘍部に直径約 5 mm の穿孔を作製した。その場で調製した ICG をテルモシリンジに充填し, 内視鏡治療用カテーテル (全長 2.4 m) と接続した。穿孔部に対して ICG を経内視鏡的に導入し, 穿孔を閉鎖した。麻酔を 1 時間保持した後, 飼育へと移行した。内視鏡観察を行うとともに, 1, 2, および 4 週に胃を摘除し, HE 染色組織観察 3. 潰瘍部への ICG 付着実験 ブタ切除胃に生理食塩水を粘膜下局注し, メスを用いて粘膜層を剥離して潰瘍を作製した。この切除胃を 37°C に加温し, 潰瘍に ICG を塗布した。ICG のゲル化後, 切除胃の HE 染色組織観察を行った。

【結果と考察】 ブタ胃穿孔の閉鎖実験により, ICG で閉鎖された穿孔部の治癒過程が明らかになった。ICG で閉鎖された穿孔周囲の潰瘍底は 1 週後に白苔で覆われ, 治癒の兆候を示した。2 週目には, 潰瘍部周囲の粘膜と肉眼的に類似した, 上皮と思われる組織で覆われた。穿孔閉鎖後 1, 2, および 4 週に摘除した胃の穿孔部の HE 染色像を図 1 に示す。1 週では ICG が穿孔を閉鎖している様子が観察された。2 週になると ICG はほぼ消失し, 穿孔部は粘膜下組織に置換されていたが, 上皮化には至っていなかった。4 週が経過すると, 健常部位と同様の上皮構造が穿孔部に形成された。生体吸収性を有する ICG が穿孔部の正常治癒の足場として機能したと考えられた。

ブタ切除胃の人工潰瘍に塗布した ICG の HE 染色像から, 粘膜下層表面でゲル化した ICG の一部が粘膜下層に侵入している様子が観察された。この結果から, ICG の粘膜下層への付着が物理的作用によるものであると推察された。ICG の有効性が非臨床で確認されたため, 今後は安全性を含めた非臨床データパッケージの取得を進め, 実用化を目指す。

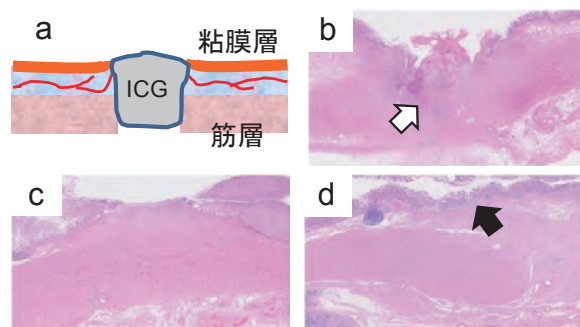


図 1 ICG で閉鎖したブタ胃穿孔の HE 染色組織像

(a) ICG で閉鎖した穿孔部縦断面の模式図, (b~d)それぞれ 1, 2, および 4 週の組織像。白矢印は ICG を, 黒矢印は粘膜層を示す。

Closure and healing of gastric perforation with injectable collagen gel which can be delivered through an endoscope

Shunji Yunoki¹, Takefumi Narita¹, Toshio Uraoka²

¹Biotechnology group, Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, ²Department of Gastroenterology and Hepatology, Gunma University Graduate School of Medicine

Tel: +81-3-5530-2671, Fax: +81-3-5530-2671, E-mail: yunoki.shunji@iri-tokyo.jp

超小口径脱細胞血管を供血血管とするラット遊離皮弁の生着

¹国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部, ²京都大学形成外科
○山中 浩気^{1,2}, 山岡 哲二¹

【緒言】内径 1mm 未満の血管吻合は遊離皮弁術や切断指再接合術などで一般的に行われているが、このようなマイクロサージャリーにおいて吻合血管の長さを補うための小口径人工血管は、未だ臨床化に至っていない。我々は内皮細胞接着性人工ペプチド(POG)₇-GGG-REDV を脱細胞血管の内腔に固定化することで、移植後極めて早期に内皮化が誘導され内径 2mm の小口径血管であっても良好な開存が得られることを報告してきた。本研究ではさらに小口径でマイクロサージャリーに適したサイズを備えたラット尾動脈(内径 0.6mm、長さ 5cm)に着目し、これを脱細胞化して内腔にペプチドを固定化した人工血管が、遊離皮弁術に利用可能かどうかをラットモデルにおいて検証した。脱細胞条件、ペプチドの固定化条件による脱細胞血管の機械的特性の変化と開存率との相関性についても併せて報告する。

【実験】脱細胞条件とペプチド固定化条件の異なる 4 種類の脱細胞血管を作製した。まず、超高压処理(UHP)による脱細胞化血管を、3 種類の温度設定(4°C, 37°C, 60°C)でペプチド修飾した(UHP-4, UHP-37, UHP-60)。また、SDS 処理による脱細胞血管を 37°C でペプチド修飾した(SDS-37)。これら 4 種類の脱細胞血管について、細胞外マトリックス(ECM)の変性とコンプライアンスの変化、ペプチド修飾効率について検討した。また、ラット遊離皮弁モデルにおいて動脈に移植し術後 3 週間での開存率と皮弁生着率を比較した。

【結果と考察】脱細胞血管のコンプライアンスは、超高压処理ではほとんど変化せず、SDS 処理で増加し、60°C 加温処理によるペプチド修飾で低下した。これらの変化は SEM で観察された ECM の変性所見に合致した。変性が重度であった UHP-60 と SDS-37 は 3 週間の開存が得られず、軽度であった UHP-4 と UHP-37 の 2 種類は開存した。これらの結果から、脱細胞過程あるいはペプチド修飾過程で生じる ECM の変性に由来する人工血管と正常血管の間のコンプライアンスの不一致が、短期開存性に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。即ち、超小口径脱細胞血管の作成においては ECM 構造をできるだけ変化させないことが望ましく、そのためには超高压処理は優れた方法である。また、ペプチドの固定性は UHP-60 と UHP-37 で良好であり、開存した UHP-37 では移植後 3 週で良好な内皮化が得られた。ペプチドの固定性が不良であった UHP-4 は 3 例中 2 例で開存したものの内皮化は確認できなかった。1 週間以上の開存が得られたケースでは皮弁は全例生着した。臨床における皮弁の autonomization は約 3 週とされていることから、本研究で作製したラット尾動脈由来の超小口径脱細胞血管は、少なくとも皮弁の生着に要する期間の一時的な graft としては十分に使用できる可能性があることが示された。

Decellularized Submillimeter-Diameter Vascular Grafts for Free Flap Survival in rat model

Hiroki Yamanaka^{1,2}, Tetsuji Yamaoka¹

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

²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kyoto University

Tel: +81-06-6833-5012 (Ext: 2633), Fax: +81-06-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

両親媒性多糖ナノゲルによるハイブリッド細胞スフェロイドの構築

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻

○久保博嵩、向井貞篤、澤田晋一、佐々木善浩、秋吉一成

【緒言】

ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞を遺伝子的にあるいは工学的に改変した細胞を移植することで行われる再生医療に期待が高まっている。一方で、治療に用いる細胞の品質管理や純度の高い細胞の供給など、安全性や細胞の機能制御における課題が指摘されている。また近年、細胞組織工学の進展により、生体組織に近い多層培養された細胞集積体や細胞スフェロイドなど三次元的に培養された細胞の構築と機能が検討されつつある。しかし、これら細胞スフェロイドの均一な集積制御や組織深部への栄養供給が困難なこともあり、人工バイオ材料と細胞のハイブリッドスフェロイドも検討されている。

本研究では、細胞スフェロイドの機能性足場材料として、タンパク質の機能制御に関わる分子シャペロン機能を有する自己組織化多糖ナノゲル架橋マイクロスフェアを用いた新規ハイブリッド細胞スフェロイド (Fig. 1) の構築とその機能に関する検討を行った。

【実験および結果】アクリロイル基が修飾されたコレステロール置換プルラン(CHPOA)からなる自己組織化ナノゲルとチオール基末端を有するポリエチレングリコールをエマルジョン中で反応させることにより、直径 5 μm 程のナノゲル架橋マイクロスフェアを得たり。まずは、96 穴マイクロウェルを用いた振盪培養法により、マイクロスフェアとヒト胎児腎細胞(HEK293)を混合することで、ハイブリッドスフェロイドを作製した。マイクロウェルを用いて作製したハイブリッドスフェロイドの直径は 150 μm 程度であった。共焦点レーザー顕微鏡観察により、その内部にナノゲル架橋マイクロスフェアの存在が確認され、また、スフェロイドを構成する細胞がスフェロイド中で伸展していることもわかった。さらに、得られたハイブリッドスフェロイドを構成する細胞は培養 1 週間後においても、100%近い細胞生存率を示した。

次に、微小重力旋回培養法によるハイブリッドスフェロイド調製を試みたところ、振盪培養法に比べて大きなハイブリッドスフェロイドが得られることが明らかとなった。微小重力旋回培養法を用いて作製したハイブリッドスフェロイドの直径は 600~800 μm 程度であった。細胞培養法や細胞の数を考えることで、ナノゲル架橋マイクロスフェア/細胞ハイブリッドスフェロイドのサイズを制御し得ることがわかった。また、ナノゲル架橋マイクロスフェアにフィブロネクチンなどの細胞接着因子を導入した後に、同様の実験を行ったところ、より効率よくハイブリッドスフェロイドを構築することが可能となった。

【参考文献】

1) Y. Tahara, S. Mukai, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 5080-5088**Construction of hybrid cell spheroids with self-assembled polysaccharide nanogel microspheres.**

Hiroataka Kubo, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi (Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyotodaigaku-katsura, Nishikyo-ku, Kyoto, 615-8510, Japan,)

Tel: +81-075-383-2589, Fax: +81-075-383-2590, E-mail: kubo.hiroataka.28m@st.kyoto-u.ac.jp.

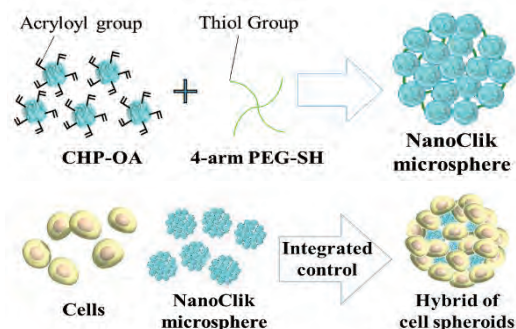


Fig.1. Schematic illustration of construction hybrid of cell spheroid

ポリマースタンプ法で調製した温度応答性パターン化表面 による細胞シート構造の制御

¹東京女子医科大学 先端生命医科学研究所, ²東京理科大学基礎工学部
○中山 正道¹, 利根川 純一², 菊池 明彦², 大和 雅之¹, 岡野 光夫¹

【緒言】 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm, 下限臨界溶液温度 LCST: 32°C) を修飾した温度応答性表面を用いて、コンフルエント培養した細胞群を低温処理で細胞シートとして回収することができる。近年、異なる高分子どうしをマイクロパターン状に修飾した温度応答性表面を利用して、異種共培養や細胞配向性を実現した細胞シートについて検討している。本研究では、従来の煩雑なパターン表面作製法を改善するために、マイクロコンタクトプリンティング (μ CP) 法を利用して、高分子を poly(dimethylsiloxane) スタンプで表面転写する簡便な手法について検討した。ここでは、poly(*n*-butylmethacrylate)-*b*-poly(*N*-isopropylacrylamide) (PBMA-*b*-PIPAAm) をスピコートした温度応答性表面上に poly(*n*-butylmethacrylate)-*b*-poly(*N*-acryloylmorpholine) (PBMA-*b*-PACMo) を転写したパターン化表面を作製する。さらに PBMA-*b*-PACMo 転写量の違いが温度応答性表面の物性と得られる細胞シートの構造に及ぼす影響について検討した。

【実験】 PBMA-*b*-PIPAAm (BMA/IPAAm: 97/251 in unit, 数平均分子量 M_n : 42000) の溶液 (0.3w/v%) をポリスチレン製培養皿 (TCPS) 上にスピコートすることで温度応答性表面を得た。次に PBMA-*b*-PACMo 溶液 (0.5, 1.5w/v%) にストライプ状パターン (幅/間隔: 50 μ m / 50 μ m) を持つスタンプで表面を浸漬し、過剰な溶液を除去後に自然乾燥した。このスタンプを TCPS または PBMA-*b*-PIPAAm コート表面上に転写した。これらの表面に正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を播種し、細胞接着状態の経日変化と 20°C 処理で得られる細胞シートの構造の違いについて評価した。

【結果と考察】 PBMA-*b*-PACMo 溶液をスタンプで転写した TCPS 表面を解析した。ATR/FT-IR 測定の結果、ポリマー濃度の増加にともない表面 PACMo 量が増加することが分かった (0.5w/v%: 0.52 μ g/cm²; 1.5w/v%: 2.41 μ g/cm²)。また静的接触角測定より、水に対する濡れ性が転写前の PBMA-*b*-PIPAAm コート表面 (47.7°) と比較して増加した (0.5w/v%: 41.8°; 1.5w/v%: 38.1°)。これらの結果は、PBMA-*b*-PIPAAm コーティング表面が転写高分子で被覆され、PACMo 鎖の特性で親水性が増大したためであると考えられた。

ストライプ状の凹凸を持つスタンプを用いて PBMA-*b*-PACMo を転写したパターン表面上で NHDF を培養した。1.5 w/v% 溶液を用いて転写した表面では、7 日間培養後もパターン形状を維持したストライプ状の接着状態が観察された。これは、長期的な細胞非接着能を維持するのに十分な親水性鎖が表面に導入されているためであると推測された。また、20°C の低温処理によりライン状の細胞組織として剥離することが可能であった。これに対して、0.5w/v% 溶液を用いて転写した表面では、培養 24 時間後にはパターン形状を維持した細胞接着が観察されたが、7 日間培養後には培養皿全体でパターンの長軸方向に沿った接着状態となった。F-actin を蛍光染色することで細胞配向性を解析した結果、高い配向性を示すことが明らかとなった。これは転写領域における PACMo 鎖が少量であり、培地中に含まれる細胞接着タンパクの吸着が緩やかに進行した、または隣接する領域に接着した NHDF から産生する細胞外マトリックスにより、細胞が PACMo 転写領域に徐々に侵入し、増殖・伸展したためであると考えられた。

以上、 μ CP 法により両親媒性ブロック共重合体を温度応答性表面に転写することで簡便にマイクロパターン化表面を作製することが可能であり、高分子転写量を調整することで細胞組織のサイズや形状、または細胞配向性を制御した細胞シートの作製に応用できることが期待された。

Control of cell sheet structure using thermoresponsive-patterned-surfaces prepared by polymer stamping method

Masamichi Nakayama¹, Junichi Tonegawa², Akihiko Kikuchi², Masayuki Yamato¹, Teruo Okano¹

¹Inst. Adv. Biomed. Eng. & Sci., Tokyo Women's Med. Univ.,

²Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci.

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

固相抽出カラムを用いた温度制御型細胞分離カラムの開発

¹慶應義塾大学 薬学部, ²東京大学大学院 工学系研究科

○長瀬 健一¹, 永田 勇貴¹, 稲永 大夢¹, 枝常 吾郎¹, 秋元 文², 金澤 秀子¹

【緒言】細胞移植により治療を行う再生医療において、細胞表面に抗体や蛍光色素の修飾をせずに、細胞の活性を維持したまま分離・精製する技術が求められている。そこで、我々は温度に応答して親水性・疎水性を変化させるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)に正荷電の官能基を導入した高分子を修飾したシリカビーズを作製し、これを充填剤としたカラムを作製した。これにより、温度制御による簡便な条件変化で細胞溶出挙動の制御を行なう細胞分離用カラムの開発を行った。

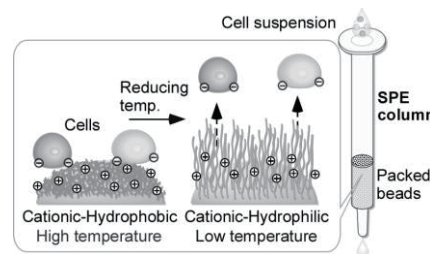


Fig.1 Temperature-responsive SPE column

【実験】シリカビーズ 106-150 μm に原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始剤を固定化した。2-プロパノールに NIPAAm、正荷電を有する *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAAm)、疎水性の *n*-ブチルメタクリレート(BMA)を溶解させ、アルゴンガスを吹き込むことにより溶存酸素を除去した。この反応溶液に ATRP の触媒を添加し、ATRP 開始剤固定化シリカビーズと反応させることで、正荷電の官能基を有する温度応答性高分子ブラシ修飾シリカビーズを作製した。作製したシリカビーズを固相抽出カラム(0.7×5.6 cm)に充填し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hbmMSC)の温度 37°Cでのカラムへの保持挙動、温度 4°Cでのカラムからの溶出挙動を観察した。

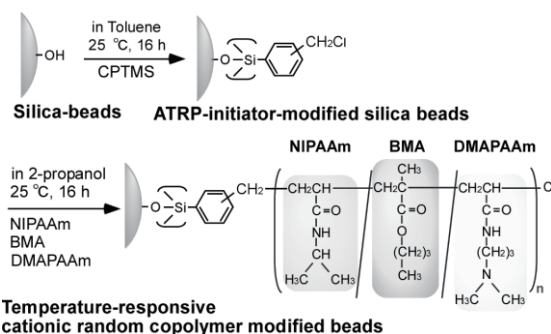


Fig.2 Preparation scheme for thermoresponsive cationic polymer brush modified beads

【結果と考察】hbmMSC を温度 37°Cで作製した固相抽出カラムに導入したところ、細胞の溶出量は少なくカラムに保持されている事がわかった。比較対照として、正荷電を持たない温度応答性高分子を修飾したカラムへの細胞保持挙動を観察したところ、温度 37°Cで多くの細胞がカラムに保持せずに溶出することがわかった。この結果より、細胞のカラムへの保持は、正荷電を有する温度応答性高分子と hbmMSC との静電的相互作用によるものと考えられる。また 4°Cに冷却した細胞培養液をカラムに流したところ、カラムに保持された hbmMSC が溶出することがわかった。これは温度応答性高分子が冷却されることにより、親水性に変化し、細胞との疎水性相互作用が弱まるためと考えられる。

これらの結果から、本研究で作製した温度応答性固相抽出カラムは温度変化により、幹細胞の保持・溶出が可能であり、間葉系幹細胞の温度変化のみによる分離の可能性が示された。

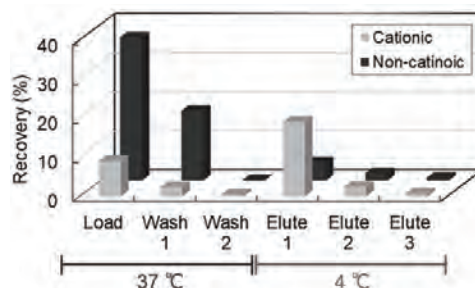


Fig.3 Cell elution behavior from the column

Development of Thermoresponsive Cell Separation Column using Solid Phase Extraction Column

Kenichi Nagase¹, Yuki Nagata¹, Daimu Inanaga¹, Goro Edatsune¹, Aya Akimoto², Hideko Kanazawa¹

¹Faculty of Pharmacy, Keio University

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

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

流動性を有する新奇培養基材の開発と細胞挙動評価

¹物質・材料研究機構 若手国際研究センター, 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

○宇都 甲一郎¹, 荏原 充宏²

【緒言】近年、弾性やトポロジーなど細胞足場の構造力学的物性が発生、組織の再生、病気の発症などの生命現象と密接に関係していることが明らかにされつつある。それ故、生体内における複雑な動的足場環境を *in vitro* 系で実現できれば、細胞-材料間相互作用の分子・細胞生物学的な解明のみならず、より高度な細胞機能の制御・操作を可能にすることが期待される。本研究で我々は、生体適合性を有し、かつ、半結晶性高分子として知られるポリ(ϵ -カプロラクトン)(PCL)共重合体の結晶-非晶転移現象に着目し[1]、“固体”または“溶融液体”としての振る舞いを見せる基材上での細胞挙動について検討した。

【実験】多価アルコールを開始剤とし、触媒としてオクチル酸スズを用いて窒素気流下で CL または D,L-ラクチド(DLLA)との開環共重合により分岐型の P(CL-co-DLLA)を合成した。得られたポリマーは、スピコート法によりガラス基板上に成膜化することで未架橋基材を調製した。さらに分岐型ポリマーの末端水酸基に反応性官能基を導入し、さらに架橋反応を行うことで架橋体も調製した。調製した架橋・未架橋培養基材上で種々の細胞(マウス繊維芽細胞(NIH3T3)、ヒト肝癌細胞(HepG2)、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)等)を用いた細胞培養実験を行い、材料-細胞間の相互作用さらには細胞機能(接着・形態・増殖・機能)について評価した。

【結果と考察】今回合成した分岐型 P(CL-co-DLLA)誘導体は、共重合体中の DLLA 組成や架橋構造の導入により融点制御が可能であるため、生体温度付近への融点の調節が容易である。未架橋材料の力学的特性を動的粘弾性測定により評価した結果、共重合組成や環境温度の違いにより‘固体’および‘粘性液体’の異なる物質状態として振る舞うことを明らかとした。これら材料は架橋の有無やその物質状態に関わらず水または培地環境下で比較的安定に存在することが確認され、培養基材としての可能性が示唆された。分岐型 P(CL-co-DLLA)基材における架橋構造または物質状態の効果を検討するため、マウス繊維芽細胞(NIH3T3)を用いて培養実験を行った。培養 24 時間後、接着した NIH3T3 の形態は、未架橋基材と比較して架橋基材上で大きく伸展している様子が確認された。一方、未架橋基材においては‘固体’および‘粘性液体’といった基材の物質状態により細胞の接着挙動が著しく異なり、基材流動性の増加に伴う細胞の接着面積の縮小が確認された(Figure 1)。架橋・未架橋基材における力学物性と細胞の接着面積との相関性を検討した結果は、従来議論されている基材弾性のみでは説明できない挙動であった。これらの結果は、細胞機能制御には固体状態における基材弾性のみならず分子運動性・流動性(粘性)等の動的な力学的要因が重要であること強く示唆するものである[2]。現在、NIH3T3 以外の他の細胞種を用いて、流動性基材上での特異な細胞挙動の解析を行っている。

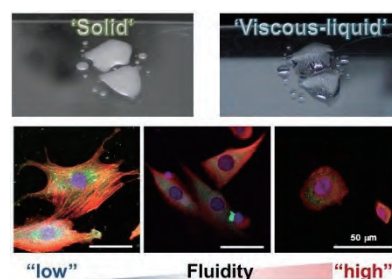


Figure 1. Photographs of P(CL-co-DLLA) derivatives with different matter state. Cell morphology is influenced by substrate fluidity.

[1] K. Uto, T. Muroya, M. Okamoto, H. Tanaka, T. Murase, M. Ebara, T. Aoyagi, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2012, 13, 064207.

[2] K. Uto, S.S. Mano, T. Aoyagi, M. Ebara, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2016, 2, 226.

Design of Novel Cell Culture Substrate with Fluidity and Characterization of Cell Behaviors

Koichiro Uto¹, Mitsuhiro Ebara²

¹International Center for Young Scientists, National Institute for Materials Science, ²International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science

Tel: +81-29-851-3354 (ext. 8816), Fax: +81-29-860-4706, E-mail: UTO.Koichiro@nims.go.jp

細胞内分解性ポリロタキサンによるマクロファージの炎症応答抑制作用

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日本医科大学大学院 医学研究科 代謝・栄養学分野

○田村 篤志¹, 大橋 萌¹, 早川 清雄², 大石 由美子², 由井 伸彦¹

【緒言】 当研究室ではこれまでに、 β -シクロデキストリン (β -CD) を細胞内環境特異的に放出する酸分解型ポリロタキサン (PRX) を設計し、細胞内環境選択的に β -CD を作用させることが脂質環境や代謝機能へ影響することを見出してきた [1]。例えば、リソソームにコレステロールが蓄積するニーマンピック病 C 型 (NPC 病) に対しては、PRX は β -CD 誘導体と比較して優れたコレステロール排泄作用、ならびにモデルマウスに対する治療効果を示すことを明らかにした [2]。このような PRX の作用は、コレステロールの代謝・排泄系に異常があるときに顕著であり、正常な細胞やマウスに対して PRX はほとんど影響を及ぼさないことを明らかにしている [2]。しかしながら、コレステロールが関連する疾患は NPC 病以外にも多数知られており、NPC 病以外の疾患に対しても PRX は有効であると期待される。ここで、動脈硬化症の発症に関連するマクロファージの炎症応答や泡沫化にはコレステロールやコレステロール前駆体の吸収・代謝・排泄の異常が関連することが知られており [3]、PRX による細胞内コレステロールへの作用がマクロファージの炎症応答に影響を及ぼすと考えられる。そこで本研究では、PRX、および β -CD がマクロファージの炎症応答に及ぼす影響を評価した。

【実験】 環状分子として β -CD、軸高分子として PEG-*b*-PPG-*b*-PEG トリブロック共重合体 (Pluronic P123)、酸解離性封鎖基として *N*-triphenylmethyl 基を用いた PRX を既報に従い合成した [4]。PRX を水溶化するため、 β -CD 部位の水酸基に 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl (MEEE) 基を修飾することで、水溶性の MEEE-PRX (β -CD 貫通数: 15.6, MEEE 基修飾数: 99.8, 分子量: 43,800) を得た [4]。比較対象として MEEE 基修飾 β -CD (MEEE- β -CD)、ならびに非分解性の MEEE 修飾 PRX も同様に合成した [5]。マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞に対し、MEEE-PRX (β -CD 濃度に換算して 0.1~2 mM) を 24 時間作用させた後に、リポ多糖 (LPS, 10 ng/mL) で刺激し、一酸化窒素 (NO) 産生量、ならびに炎症性サイトカイン類 (IL-6, IL-1 β , TNF- α , iNOS) の遺伝子発現量を評価した。また、細胞内のコレステロール含量は GC-MS により定量した。

【結果と考察】 RAW264.7 に対し MEEE-PRX、MEEE- β -CD のみを作用させた結果、NO 産生量や炎症性サイトカインの遺伝子発現に顕著な変化は認められなかった。しかしながら、MEEE-PRX を作用させた RAW264.7 に対して LPS を作用させた結果、LPS 刺激による NO 産生量や炎症性サイトカインの遺伝子発現が有意に抑制されることが明らかになった。このとき、LPS で刺激した細胞では細胞内コレステロール含量の増加が認められたが、MEEE-PRX を作用させることでコレステロール含量の増加は抑制された。一方、MEEE- β -CD や非分解性の PRX ではそのような抗炎症作用は認められなかった。重要であると考えられる。以上の結果より、MEEE-PRX は細胞内で β -CD を局所的にリリースすることで LPS により惹起される炎症応答を抑制することが示唆された。このような PRX の作用は、動脈硬化症など炎症が原因となる疾患の予防、治療に役立てることができると期待される。

References

- [1] 田村篤志. *バイオマテリアル—生体材料—* 36, 16-17 (2018)., [2] A. Tamura, N. Yui. *J. Control. Release* 269, 148-158 (2018)., [3] A. R. Tall, L. Yvan-Charvet. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 104-116 (2015)., [4] A. Tamura, M. Ohashi, N. Yui. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 28, 1124-1139 (2017)., [5] A. Tamura, M. Ohashi, K. Nishida, N. Yui. *Mol. Pharm.* 14, 4714-4724 (2017).

Inhibition of inflammatory responses of macrophages by intracellularly degradable polyrotaxanes.

Atsushi TAMURA¹, Moe OHASHI¹, Sumio HAYAKAWA², Yumiko OISHI², Nobuhiko YUI¹

¹Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (TMDU). ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School. Tel: +81-3-5280-8022, Fax: +81-3-5280-8027, E-mail: tamura.org@tmd.ac.jp

血管機能評価のための *in vitro* 遺伝子ノックダウン微小血管モデル

¹ 東京大学生産技術研究所, ² 東京大学大学院 工学系研究科バイオエンジニアリング専攻, ³ 東京大学生産技術研究所 LIMMS/CNRS-IIS (2820) 国際連携研究センター, ⁴ CNRS/IIS/COL/ Université Lille 1, SMMiL-E project, ⁵ Université Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161
○ 薄葉 亮^{1,2}, Joris Pauty^{1,3,4}, Fabrice Soncin^{4,5}, 松永 行子^{1,2,3,4}

【緒言】

血管新生は、酸素不足部位へ血液を供給すべく毛細血管を新たに作り出す生理現象であり、腫瘍組織のような虚血性部位から分泌される血管内皮成長因子(VEGF)により誘導される。血管が VEGF のシグナルを受容すると、血管の内膜を構成する血管内皮細胞が VEGF 高濃度領域へ向かって新生血管を形成し始める。腫瘍における血管新生の抑制は創薬のターゲットであり、このような血管新生において重要な役割を持ち、その発現が変化する分子の一つとして Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) が注目されている。EGFL7は血管新生、管形成、血管の極性制御等に影響を及ぼすことが示唆されているが⁽¹⁾、新生血管における EGFL7 の働きは不明な点が多く残されている。そこで本研究では EGFL7 をノックダウンさせた血管内皮細胞から *in vitro* 微小血管モデルを作製し、EGFL7 の血管新生および血管機能への働きを細胞レベルで観察することを目的とした。

【実験】

微小血管モデルは、シリコーンゴムで作製したチャンバー内へコラーゲン溶液を導入・ゲル化後に、直径 200 μm のマイクロニードルにより貫通させた中空にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を播種することで作製した^(2,3)。ノックダウンモデルの作製には、低分子干渉 RNA をトランスフェクションした HUVEC を用いた。これらの微小血管を、高濃度の VEGF (10 mg/mL)を添加した血管内皮成長培地で培養することで血管新生を誘導した。また、蛍光標識化デキストラン分子 (70 kDa) を中空構造に流し、血管機能の一つである血管透過性について評価を行った。

【結果と考察】

VEGF 刺激によりコントロール血管では血管新生挙動を示すが、EGFL7 ノックダウン細胞で作製した微小血管では、新生血管の長さが短く、血管新生の抑制傾向が見られた。さらに、新生血管部位を詳細に観察すると、通常は新生血管の先端細胞のみに見られる「糸状仮足」というアクチン線維を有する突起が EGFL7 ノックダウン血管では新生血管全体に広く観察された (Fig.1)。また、mRNA の発現量測定では、新生血管の血管内皮細胞を制御する Notch シグナル経路に関わる遺伝子発現が増減していた。よって、EGFL7 の発現低下は、Notch シグナル経路の変化を伴い、先端細胞の無秩序な発生を誘引し異常な血管新生をもたらすことが示唆された。

さらに、EGFL7 の発現低下による血管バリア機能への影響を調べると、EGFL7 ノックダウン血管は、コントロール血管と比べて透過性が高く、血管バリア機能の低下が見られた。血管内皮細胞の接着結合分子である血管内皮カドヘリンを観察すると、EGFL7 ノックダウン血管では結合の形成が弱く、透過性評価と一致する結果となった。

以上の結果から、本研究の *in vitro* モデルは血管機能を制御する遺伝子評価への応用が期待できる。

【文献】

(1) Nichol et al., *Blood* **2012**, 9, 1345-1352. (2) Pauty et al., *EBioMedicine* **2018**, 27, 225-236. (3) Pauty and Usuba et al., *Nanotheranostics* **2017**, 1, 103-113.

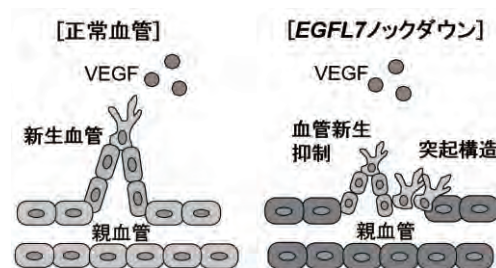


Fig. 1 EGFL7 ノックダウン血管で得られた血管新生の模式図

In Vitro Gene Knockdown Microvessel Model to Study the Vascular Function

Ryo Usuba^{1,2}, Joris Pauty^{1,3,4}, Fabrice Soncin^{4,5}, Yukiko T. Matsunaga^{1,2,3,4}

¹Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, ²Department of Bioengineering, The University of Tokyo, ³LIMMS/CNRS-IIS UMI 2820, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, ⁴CNRS/IIS/COL/Université Lille 1, SMMiL-E project, ⁵Université Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161

Tel: +81-3-5452-6470, E-mail: mat@iis.u-tokyo.ac.jp

間葉系幹細胞の脳梗塞部位への選択的な集積を目指した細胞表面修飾材の創製

¹ 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻, ² 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻, ³ Uppsala University, Department of Immunology, Genetics and Pathology
○岡田直也¹, 井上祐貴², 石原一彦², 寺村裕治^{1,3}

【緒言】近年、間葉系幹細胞 (MSC) を脳梗塞患者へ移植することで、一部の神経機能が回復し脳梗塞に対して治療効果が認められたとの報告がされた (O Honmou, *et al.*, *Brain*, 1790, **134** (2011))。しかしながら、脳梗塞部位に対する MSC の集積数は不明であり、また神経機能の回復に MSC が直接寄与しているのか、MSC の液性因子が寄与しているのかに関しては解明されていない。本研究では、脳梗塞部位を認識する分子で MSC 表面を修飾することで選択的に集積させ、MSC との細胞間相互作用により神経再生効果や血管新生を向上させることを目的とする。脳梗塞部位では虚血にともない活性化した血管内皮細胞上に様々な膜タンパク質が発現する。この一つである E-selectin へ結合する短鎖ペプチド (ES-bp) を、poly(ethylene glycol) 鎖を有する脂質 (PEG 脂質) 誘導体を介して MSC 表面に導入した。ここでは、MSC に導入した ES-bp-PEG 脂質の *in vitro* 評価について報告する。

【実験】C 末端にシステインを導入した E-selectin に特異的に結合する短鎖ペプチド (ES-bp : DITWDQLWDLMKGGGC) を用いた。マレイミド-PEG 脂質 (PEG : 5.0kDa) と ES-bp をモル比 1.2 : 1.0 で混合し、PEG 脂質濃度が 1.0 mg/mL となるように PBS 中 (pH7.4) に溶解させた。これを室温で 24 時間振とうし、システインとマレイミドを反応させることで ES-bp-PEG 脂質を得た。MSC への ES-bp-PEG 脂質の修飾状態を調べるために、N 末端に蛍光標識 FITC を導入した FITC-ES-bp-PEG 脂質を用意し、MSC を修飾して観察を行った。MSC (3.6×10^5 個) に対して、 $1.6 \times 10^2 \mu\text{mol/L}$ の FITC-ES-bp-PEG 脂質を 60 μL 添加し室温で 30 分間反応させた。その後培地を添加し遠心することで未修飾の FITC-ES-bp-PEG 脂質を除去し、培地に再懸濁して共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、E-selectin に対する ES-bp-PEG 脂質の接着能を調べるために、E-selectin を固定化した基板表面に対して、ES-bp-PEG 脂質を修飾した MSC と非修飾の MSC を播種した。これを 37°C で一定時間静置した後、培地で十分にリンスして位相差顕微鏡で観察した。

【結果と考察】FITC-ES-bp-PEG 脂質を修飾した MSC を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、MSC の内部には蛍光は見られず、細胞膜表面にのみ検出されていた (Figure 1)。このことから、ES-bp-PEG 脂質は MSC の表面にのみ導入されていることが分かった。また、E-selectin を固定化した基板表面に対して、ES-bp-PEG 脂質を修飾した MSC では、播種後 30 分間において MSC の周囲が接着・伸展していることが観察できた (Figure 2)。他方、無処理の MSC では、接着細胞ではあるものの、この時間内においては接着している様子は観察されず、洗浄することで、基板表面から剥離することが観察された。このことから、脳梗塞発症部位に発現する E-selectin に対して、短鎖ペプチドと PEG 脂質を利用することで、MSC の初期接着を誘導できることが示唆された。

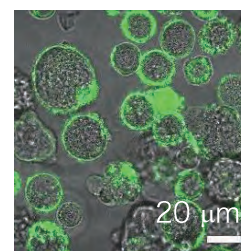


Figure 1 MSCs modified with FITC-ES-bp-PEG lipid

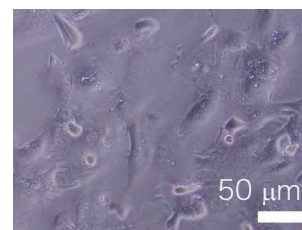


Figure 2 MSCs to adhere to E-selectin immobilized surface

Cell surface modification of mesenchymal stem cells for selective delivery to cerebral infarction area

Naoya OKADA¹, Yuuki INOUE², Kazuhiko ISHIHARA², and Yuji TERAMURA^{1,3}

¹Department of Bioengineering, The University of Tokyo, ²Department of Material Engineering, The University of Tokyo, ³Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Sweden
Tel: +81-03-5841-1174, E-mail: okada@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

ガンマ線照射が多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 (HAp/Col) に与える影響

平井敬悟 1、江川聡 1、松本連平 1、吉井俊貴 1、大川淳 1、中島武彦 2、早乙女進一 3

1 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 整形外科学分野

2 HOYA Technosurgical 株式会社

3 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 整形外傷外科治療開発学講座

【背景・目的】多孔質 HAp/Col は多孔体形成後、加熱脱水縮合によりコラーゲン線維を架橋しガンマ線照射で滅菌される。以前行った検討では、ガンマ線照射により、特に筋肉内での吸収が亢進することが確認された。今回、ガンマ線量、架橋とガンマ線照射の順序が多孔質 HAp/Col の筋肉内での吸収性に与える影響に関して検討を行った。

【方法】実験 1. HAp/Col の多孔体 (5x5x5mm) を作成し 140℃で架橋を行い、0, 5, 25, 50kGy のガンマ線照しラットの背部筋層内に移植した。また、BMP-2 を含侵させたものも移植し、マイクロ CT 撮影および組織学的評価を行った。実験 2. 多孔体作成後、架橋のみを行った 0kGy 群、架橋後に 35kGy のガンマ線照射を行った 35kGy 群、さらに架橋前に 35kGy のガンマ線照射を行った後に架橋を行った 35kGy-R 群の多孔質 HAp/Col を作成し実験 1 と同様に移植し評価を行った。

【結果】実験 1. 0, 5kGy 群は移植後 2 週においても気孔構造が維持された。25, 50kGy 群は両群とも移植後 1 週で気孔構造は破綻し球状に膨化した。組織所見では HAp/Col は断片化しており膨化した内部は細胞成分に乏しく漿液腫が形成された。BMP-2 を添加したものは 0, 5kGy 群は HAp/Col の形状に一致した旺盛な骨形成を認めた。25, 50kGy 群では膨化に一致した球状（殻状）の骨形成をわずかに認めただけだった。実験 2. 35kGy 群は実験 1 と同様に移植後 1 週から HAp/Col は膨化し漿液腫を形成した。対して、ガンマ線照射後に架橋処理を加えた 35kGy-R は移植後 2 週間まで、0kGy と同様にインプラントおよび内部の気孔形状が維持されていた。

【考察】多孔質 HAp/Col はガンマ線照射により、筋肉内での吸収性、崩壊性が亢進すること、その過程で漿液腫が形成されることが確認された。またガンマ線照射後に架橋処理を加えることで、これらの影響を抑制でき、BMP の担体として使用する場合にも有効であると考えられた。

骨折治癒過程における骨質の変化

¹千歳科学技術大学理工学部応用化学生物学科,²千歳科学技術大学大学院光科学研究科,³北海道大学大学院医学研究院整形外科学教室

○木村-須田 廣美^{1,2}, 伊藤 哲平², 兼平 裕也², 清水 智弘³, 原 涼大¹, 高畑 雅彦³

【緒言】副甲状腺ホルモン製剤(PTH)は骨密度を増加させて骨強度を改善する一方、骨折治癒促進効果があることも報告されている。これまでラットを用いた研究において、PTH にビタミン K やビタミン K の拮抗薬であるワルファリンを併用投与した系では、大腿骨骨折部位に形成された仮骨(Fig.1)の強度がそれぞれ増加あるいは低下することを確認している¹⁾。骨強度計測には三点曲げ試験を用いたが、臨床において骨強度を直接計測することは難しく、実際は X 線や超音波を使った骨密度計測が代用されている。一方、骨強度は骨密度が 70%、骨質が 30%程度影響を受けると考えられている。したがって骨折治癒過程における骨質の変化を知ることは、骨密度計測とともに骨強度を評価する上で極めて重要である。骨質は大きく骨の構造特性と材料特性に分けられるが、我々は赤外イメージングやラマンイメージングなど振動分光法を用いて材料特性である石灰化度、ヒドロキシアパタイトに含まれる炭酸塩含有率、結晶化度、ミネラル成熟度、コラーゲン線維配向性、ヒドロキシアパタイト配向性などを評価してきた。本研究では、大腿骨骨折モデルラットに PTH を単独投与、PTH とビタミン K を併用投与、また PTH にワルファリンを併用投与し、それぞれ骨折治癒過程で認められる骨質の変化について評価したので報告する。



Fig.1 Femoral shaft fracture callus

【実験】12 週齢、雌 Sprague-Dawley(SD)ラットを用いて大腿骨骨折モデルを作製した。ラットは、それぞれ 1)リン酸緩衝生理食塩水(PBS)投与群、2)PTH 投与群、3)PTH とビタミン K 併用(PTH-K)投与群、4)PTH とワルファリン併用(PTH-W)投与群の 4 群に分け、各薬剤を一定の間隔で投与しながら 8 週間飼育した後安楽死させ、それぞれ骨折治癒過程にある大腿骨を得た。大腿骨は三点曲げによる骨癒合部の骨強度計測のほか、赤外イメージング、赤外二色性イメージング²⁾による骨質評価を行った。

【結果と考察】骨癒合部の骨強度は、PBS<PTH-W<PTH<PTH-K の順であった。典型的な仮骨形成が認められた PTH-K と PTH-W を比較した結果、PTH-K では十分な骨癒合を認めたが、PTH-W では不十分であった。PTH-K の骨癒合部位では、正常な骨幹と比べて石灰化度や結晶化度が低値を示し、コラーゲン線維と低結晶性アパタイトが骨軸に対して垂直方向に配向することを確認した。正常な骨幹のコラーゲン線維が骨軸に沿って配向していることから、骨軸に垂直なコラーゲン線維配向性は、仮骨特有であることが示された。また、仮骨が吸収された後のコラーゲン線維は、正常な骨幹と同様に骨軸に沿って配向することも確認できた。特に、皮質骨中心部のコラーゲン線維配向性が向上し、同部位の石灰化度や結晶化度も増加することが認められた。これらの結果から、骨軸に沿ったコラーゲン線維配向性が骨強度向上に繋がることが示された。

参考文献：

- 1) T. Shimizu *et al.* Bone, **64**, 95-101 (2014)
- 2) T. Ito *et al.* Mol. Cryst. Liq. Cryst., **654**, 244-248 (2017)

Bone quality changes associated with bone fracture healing

Hiroimi KIMURA-SUDA^{1,2}, Tepei ITO², Yuya KANEHIRA², Tomohiro SHIMIZU³, Ryota HARA¹, Masahiko TAKAHATA³

¹Department of Applied Chemistry and Bioscience, Chitose Institute of Science and Technology

²Graduate School of Photonics, Chitose Institute of Science and Technology

³Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

Tel: +81-123-27-6008, Fax: +81-123-27-6008, E-mail: kimurasu@photon.chitose.ac.jp

新規電子放出デバイスを用いた骨芽細胞 MC3T3-E1 の増殖、分化制御

○植村寿公^{1,2}、杉森文亮³、平川弘幸³、筒井藍³、岩松正³、上村葉²、森田健一²、津村尚史²
¹大阪大学大学院工学研究科, ²(株)ジェイテックコーポレーション ³シャープ株式会社

【緒言】物理的刺激(力学的、電気、磁気など)の生体への影響に関する研究は、生物学的興味以上に、薬剤投与より安全性の面でリスクが小さいため、リハビリテーション、再生医療などへの医療応用の期待される分野である。その中で、電氣的刺激は、特に骨折治療など、整形外科などの医療現場で用いられるなど、明らかな効果があることが知られている。一方、そのメカニズムは組織レベルでの効果なのか、細胞レベルでの効果なのか、骨芽細胞に影響があるのなら、どの分化段階に、どのように電気刺激が関与しているのか明らかでない。シャープ株式会社が新たに開発した電子放出技術は大気中に安定した電子放出を可能とし、オゾンが発生しない利点がある(文献1)。今回、この新規電子放出素子を細胞培養用プレートに搭載できるモジュールを開発し、骨芽細胞株である MC3T3-E1 に電子放出による電気刺激を加え、増殖率、骨芽細胞分化マーカー(ALP 活性、collagen typeI, osteopontin, cbfa1, osteocalcin の mRNA 発現)等を測定し、その増殖、分化への影響を調べたので報告する。

【実験】6 ウェル培養用プレートに、各ウェルごとに計6個の電子放出デバイスを培地液面上方、1mmのエアギャップをもつように、プレート蓋にセットした。ATCC より購入した骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞(初期播種量 50000 個/well)を α -MEM(Gibco) (10%FBS, 1% antibiotic-antimycotic 含有)中、37°C、5%CO₂ 下で培養し、電子放出刺激(EES)を与えた。EES システムは、金電極が素子近傍に固定され、DC バイアス(-600V)に対し 13.5~22.0V 高い電圧(Vd) (矩形波形: 528Hz)を加えることにより電子放出が起こる。放出した電子は collector 電極(培地中、接地されている)で回収され電流値(Ie)をモニターした。EES は播種後 1 日目(day0)、2 日目(day1)にインキュベータ中で1分間加えた。day2, 3, 6, 9 に細胞を回収し、増殖率、骨芽細胞分化マーカーを調べた。増殖率は細胞カウントにより、ALP 活性は LaboAssay™ ALP kit(WAKO)を用いて、マーカーの mRNA 発現は Taqman Gene Expression Assays(Applied Biosystems)を用いた定量的 PCR により行った。

【結果と考察】EES の増殖率への影響は、Vd, Ie の組み合わせにより異なった。day3 で比較すると、Vd を固定(15.0V)し Ie を増加(0.5~2.3 μ A)させると、増殖率は亢進した。一方、Ie を固定(1.2 μ A)し Vd を増加(13.5~22.0V)させると増殖率は減少した。最大 16%の増殖率の亢進を得た。また、初期播種細胞数、25000 細胞と 50000 細胞を比較すると、低播種細胞の場合が高い増殖率を示した。これらの結果は、単位細胞数あたりの放出電子数に増殖が大きく依存することを示している。骨芽細胞の分化マーカーの発現について、同様に Vd を固定し、Ie を増加させることにより、collagen typeI, cbfa1, osteocalcin の mRNA 発現が、Ie に対し単調に増加した。一方、osteopontin は大きな変化を示さなかった。collagen typeI, cbfa1, osteocalcin は骨芽細胞の分化に関わる遺伝子であり、Ie、つまり放出電子数が骨芽細胞分化に大きく影響していることを示している。Osteopontin は破骨細胞とともに骨リモデリングに関わるファクターであり、電子放出の骨リモデリングへの影響は小さいと考えられる。ALP 活性は、電子放出により、day3 で 30% 亢進した。その後、徐々に電子放出の効果は減衰し day9 では 5%の差しかなかった。以上の結果から、電子放出は、2回の短時間刺激によっても、骨芽細胞に対し、Ie(放出電子数)に依存して、増殖、分化を亢進することが分かった。この新しい細胞培養システムの医療応用への可能性が示唆された。

文献 1. 岩松、平川、山本、日本画像学会誌 56(1) 16-23 (2017)

Modulation of Proliferation and Differentiation of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells by Novel Electron Emission Device Toshimasa Uemura^{1,2}, Fumiaki Sugimori³, Hiroyuki Hirakawa³, Ai Tsutsui³, Tadashi Iwamatsu³, Yo Uemura², Kenichi Morita², Takashi Tsumura² ¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²JTEC CORPORATION, ³SHARP CORPORATION

Tel/Fax: +81-6-6879-4973, E-mail: uemura@prec.eng.osaka-u.ac.jp

歯周靭帯再生を目指した靭帯マトリクス-人工歯の結合モデルの開発

¹ 芝浦工業大学 システム理工学部, ² 芝浦工業大学 大学院システム理工学専攻, ³ 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ⁴ 東北大学 大学院歯学研究科
 ○中村 奈緒子¹, 春風 宏樹², 大平 涼太¹, 木村 剛³, 山田 将博⁴, 岸田 晶夫³

【緒言】歯根靭帯は、歯と骨をつなぎ、歯を支持するだけでなく、細菌の感染防止や噛みごたえの感覚をつかさどるなど、多くの機能を担っている。我々は、次世代の歯科治療技術として、人工歯と歯根膜を一体化させ歯根膜機能を担持させた人工歯周組織ユニットの開発を目指した。これまでに、歯根膜マトリクスと歯槽骨を有する脱細胞化下顎骨に人工歯を挿入し、人工歯・歯根膜・下顎骨一体型のユニットをラット腎被膜移植し、歯周組織再構築能について検討した。人工歯として、抜去歯を microCT にて撮像し 3-D プリンターにて同形状に造形した 3-D プリンター歯を用いた。その結果、ラット宿主細胞が歯根膜マトリクスの線維に沿って浸潤・配向し、本来の歯根膜組織と類似した形態を示し、また、歯根膜マトリクス線維が人工歯表面に接合している様子が観察された。本研究では、歯根膜マトリクスの人工歯との結合についてより詳細に検討するため、靭帯マトリクスシートと人工歯材料プレートを用いた簡易モデルの構築を目指し、歯周靭帯を模擬したシート状の細胞外マトリクスと、人工歯表面を模擬したプレートを接触させ、生体内に移植することで、細胞外マトリクスと材料表面を結合させることを目的とした。

【実験】ブタ靭帯をシート状に成形し、脱細胞化による生体由来の靭帯マトリクスシートの調製を試みた。種々の界面活性剤を用いた化学的処理、および高静水圧印加を用いた物理的処理を脱細胞化処理法として用いた。脱細胞化処理により調製した靭帯マトリクスシートについて、残存 DNA の定量および組織学的評価を行った。さらに、脱細胞化処理法の違いによる生体反応を明らかにするため、靭帯マトリクスシートの細胞外マトリクスへの細胞の浸潤や細胞の配向性について検討した。一方、人工歯側のアプローチとして、人工材料の表面改質を行った。本実験ではモデル実験としてポリエチレンフィルムを用いた。ポリエチレンフィルムの表面に種々の濃度のアクリル酸をグラフト重合し、グラフト量の異なるポリエチレンフィルムの作製を試みた。次に、種々のグラフト量のポリエチレンフィルムをリン酸水素ナトリウム溶液と塩酸カルシウム溶液に交互に浸漬し、グラフト表面への石灰化を行った。

【結果と考察】細胞化処理により調製した靭帯マトリクスシートの残存 DNA 定量および組織学的評価の結果、細胞成分の除去が確認された。また、種々の濃度のアクリル酸をグラフト重合した結果、高濃度のアクリル酸ではグラフト量が多かった。さらに、交互浸漬法による石灰化を試みた結果、グラフト表面へのカルシウム成分の沈着が確認された。以上より、靭帯マトリクスシートと人工歯材料プレートをを用いた簡易モデルの構築の可能性が示唆された。

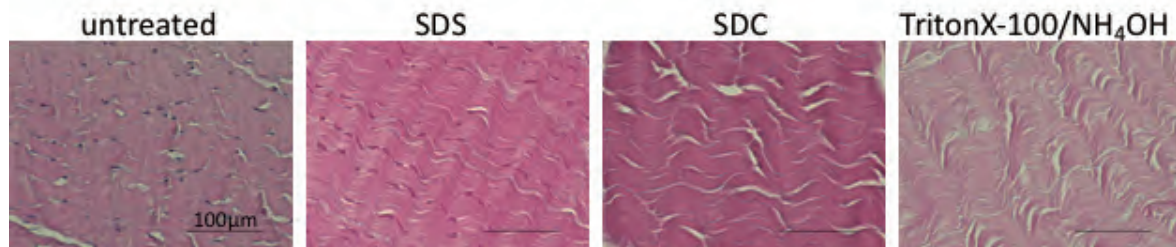


Fig. 1 Histological images of hematoxylin and eosin-stained samples.

Development of Ligament Matrix Sheet for Regeneration of Periodontal Ligament

Naoko Nakamura¹, Hiroki Harukaze², Ryota Ohira¹, Tsuyoshi Kimura³, Masahiro Yamada⁴, Akio Kishida³

¹College of Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

²Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

³Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

⁴Graduate School of Dentistry, Tohoku University

Tel: +81-48-720-6014, Fax: +81-48-720-6011, E-mail: naoko@shibaura-it.ac.jp

歯髄幹細胞集合体の血管内皮細胞分化誘導による 機能的な歯髄様組織の構築

¹大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座（歯科理工学教室），²大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室），³ Department of Dental Biomaterials, College of Dentistry, Wonkwang University, ⁴大阪大学大学院歯学研究科先端機能性材料学共同研究講座
○佐々木 淳一¹，堅田 千裕^{1,2}，Gabriela L. Abe¹，Aifang Han¹，Seongjin Shin³，
Ji-Myung Bae³，今里 聡^{1,4}

【緒言】

われわれは，組織工学的手法を用いて，歯髄様組織としての三次元細胞集合体を *in vitro* で構築し，これを歯髄が除去された歯に移植する新たな再生医療技術の開発に取り組んできた．そして，これまでに，温度応答性高分子 poly-N-isopropylacrylamide (pNIPAAm) ゲルを用いることで歯髄幹細胞 (DPSC) から成る三次元細胞集合体が作製できること，さらに DPSC 集合体が歯髄再生用材料として有望であることを明らかにしてきた [1]．本研究では，より効率的な歯髄再生を実現するための血管網構造を有する細胞集合体を作製することを目的に，DPSC の血管内皮細胞への分化能を二次元培養環境下で評価するとともに，DPSC 集合体に対して血管内皮細胞分化誘導を行った場合の構造と遺伝子発現の変化について検討した．

【実験】

ヒト第三大臼歯由来 DPSC の通常培養には， α MEM 培地に 15% ウシ胎児血清および 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培地（通常培地）を用い，血管内皮細胞の分化誘導には，内皮細胞用培地に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を加えた培地（分化誘導培地）を用いた．まず，DPSC の血管内皮細胞への分化能を検討するため，DPSC を培養皿上で分化誘導培地を用いて培養し，血管内皮細胞マーカーである VE-cadherin, CD31, VEGF receptor-2 の発現量をウェスタンブロット法で評価した．また，分化誘導した DPSC の血管内皮細胞としての機能の評価するために，DPSC を通常培地あるいは分化誘導培地を用いてマトリゲル上で三次元培養した．つづいて，DPSC からなる三次元細胞集合体に対する分化誘導の効果を検討するために，DPSC 集合体を分化誘導培地で最大 20 日間まで培養した後，薄切片試料を作製し，CD31 および Alpha Smooth Muscle Actin (SMA) の免疫蛍光染色を行った．さらに，同様に分化誘導培養した集合体の外層および内層から細胞を取り出し，それぞれの層を構成する DPSC の VEGFA, CXCL1, Nanog の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で検討した．

【結果と考察】

DPSC を分化誘導培地で培養すると，血管内皮細胞マーカーの発現が培養 7 日目まで経時的に増加した．また，DPSC をマトリゲルで三次元培養したところ，通常培地では DPSC は増殖しなかったが，分化誘導培地では毛細血管様の網目状構造を形成した．この結果から，分化誘導培地で培養することで，DPSC は血管内皮細胞様細胞に分化できることが示された．DPSC 集合体を分化誘導培地で培養したところ，集合体外層に CD31 と SMA を発現する細胞が局在しており，さらにこれらの細胞が集合体外層で管腔用構造を構築していることが分かった (Fig.)．また，リアルタイム PCR の結果，集合体外層の細胞は内層の細胞と比較して VEGFA と CXCL1 が有意に多く発現している一方で，Nanog の発現が有意に少ないことが分かった．以上のことから，DPSC 集合体を分化誘導することで，血管様構造を有する機能的な歯髄様組織を構築できることが示唆された．

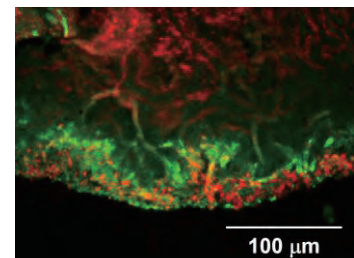


Fig. Luminal structure in DPSC construct.

【参考文献】

[1] Itoh Y, Sasaki JI, *et al.* Journal of Dental Research, in press, 2018.

Fabrication of Dental Pulp-like Tissue by Endothelial Differentiation of 3D DPSC Construct

Jun-Ichi SASAKI¹, Chihiro KATATA^{1,2}, Gabriela L. ABE¹, Aifang HAN¹, Seongjin SHIN³,
Ji-Myung BAE³, Satoshi IMAZATO^{1,4}

¹Department of Biomaterials Science, ²Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, ³Department of Dental Biomaterials, College of Dentistry, Wonkwang University, ⁴Department of Advanced Functional Materials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry Tel: +81-6-6879-2919, Fax: +81-6-6879-2916 E-mail: jun1-s@dent.osaka-u.ac.jp

インジェクタブル細胞架橋ゲルを用いた骨格筋再生

¹甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科, ²甲南大学フロンティアサイエンス学部
○木村 友香¹, 武本 綾佳¹, 長濱 宏治²

【緒言】近年私たちは、細胞を架橋点として高分子ネットワークに組み込んだハイドロゲル（細胞架橋ゲル：cell cross-linked hydrogels, CxGels）を開発した [1]。CxGels は、ゲル内の細胞が示す高い機能や様々な応答がマイクロ刺激となり、ゲルネットワークを介してこの刺激をゲル全体に伝播・増幅するシステムであるため、ゲルそのものが細胞の機能や応答を示すことになり、新しい細胞基盤テクノロジーとして、医療分野に応用可能であると期待される。最近私たちは、CxGels がインジェクタブルゲルとなることを見出し、新しい細胞移植・再生医療材料として応用できるのではないかと着想した。さらに、様々なヒト細胞を用いて CxGels を作製できることも見出した。これらより、再生を目指す生体組織に本来含まれている細胞を組み合わせることで CxGels を作製すれば、ゲル内にその組織内の類似環境を再現でき、移植細胞の組織化や機能発現を促進することにつながると考えた。本発表では、CxGels のインジェクタブルゲルとしての諸物性を詳細に解析し、骨格筋組織をモデルとして、組織再生材料としての可能性を評価した。

【実験】糖鎖工学によりアジド基を細胞膜タンパク質の糖鎖に導入し、アジド化細胞とアルキン化アルギン酸 (bAlg-DBCO) を 37°C でクリック化学架橋することで CxGels を作製した。ゲル形成時間やゲルの力学特性をレオメータにて調べた。ゲル内の細胞の応答がゲルの機能発現に利用できるか調べるため、細胞架橋ゲル内の細胞生存率、細胞の代謝反応、細胞増殖などを調べた。マウスへの皮下投与を行い、CxGels 内の細胞の挙動を調べた。また、細胞架橋ゲルの再生医療への応用例として、マウス筋芽細胞 (C2C12) で作製した細胞架橋ゲルを大腿筋損傷モデルマウスの患部に注射投与し、筋組織の再生および筋力の回復を調べた。

【結果と考察】アジド化 C2C12 細胞のペレットに bAlg-DBCO 水溶液を加えて懸濁した後、37°C で反応させて CxGels を作製した。Live-dead アッセイによって CxGel 内の細胞の生存率を算出したところ、1 週間にわたり約 90% 以上の高い生存率を示した。また、ゲル内の細胞数を 1 週間調べたところ、細胞数の増大とゲルの崩壊が相関した。これより、CxGels では、自発的な細胞分裂によりゲルの重量は増え (self-growing gels)、さらに細胞分裂による架橋点の減少が、ゲルの分解につながるということが分かった。CxGels をシリンジにより吐出すると吐出した場所でゲルが得られたことより、インジェクタブルゲルであることが示された。マウス皮下へ CxGels を注射投与したところ、皮下でゲル形成され、コントロール (アジド化細胞をアルギン酸

または PBS で懸濁した溶液の投与) に比べ細胞の配向性は高く筋繊維も有意に太かった。細胞架橋ゲルを投与した大腿筋損傷モデルマウスでは、コントロールでは見られなかった筋繊維の形成が投与部位で確認でき、約 2 倍高い筋力回復を示した。以上より、細胞架橋ゲルはインジェクタブル細胞移植材料および組織再生材料としての可能性が示された。

[1] Nagahama K., Kimura, Y. and Takemoto A., *Nature Commun.*, 9, 2195 (2018).

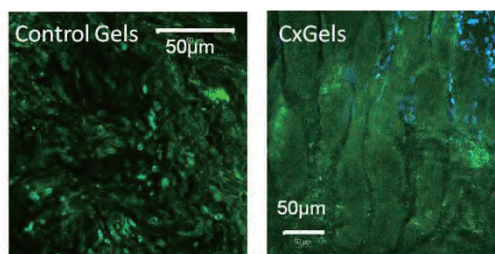


Figure 1. Lifeact-GFP 発現 C2C12 細胞を内包したアルギン酸ゲル (左) および Lifeact-GFP 発現 C2C12 細胞で作製した CxGels (右) をマウスに移植して 15 日後の各ゲルの共焦点顕微鏡画像。緑: Lifeact-GFP, 青: Hoechst.

Development of skeletal muscle regenerative technology using injectable cell cross-linked hydrogels

Yuka KIMURA¹, Ayaka TAKEMOTO¹, Koji NAGAHAMA²

¹Graduate school of Nanobiochemistry, Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University, Kobe 650-0047, Japan. ²Department of Nanobiochemistry, FIRST, Konan University, JapanTel: +81-78-303-1328, Fax: +81-78-303-1495, E-mail: nagahama@center.konan-u.ac.jp

CVD グラフェン転写 PDMS 基板によるヒト間葉系幹細胞の培養

¹ 日本工業大学応用化学科, ² 日本工業大学創造システム工学科, ³ 産業技術総合研究所ナノ材料研究部門

○伴雅人^{1,2}, 下田亮太², 石原正統³, 沖川侑揮³, 長谷川雅考³

【緒言】材料工学的・物理的な視点から細胞分化を制御する手法、すなわち、足場材料の表面構造・特性を利用し物理刺激を細胞に与え分化を誘導する方法が注目されている。このような中、我々は、材料工学的なアプローチとして、高い弾性率、導電率およびナノ薄膜といった特異な特性を持つグラフェンを足場基質に応用する研究を進めている。これまで、ポリジメチルシロキサン (PDMS) に転写した表面波励起マイクロ波プラズマ (SWP) CVD 法によるグラフェン膜¹⁾の表面形態が、細胞の増殖や形態変化に大きな影響を持つことを見出している²⁾。本研究では、このグラフェンを転写した PDMS 基板のヒト間葉系幹細胞の分化誘導への効果について調査した。

【実験】PCVD 法を用いて銅箔基板上にグラフェンを蒸着させた。これを、PDMS (硬化剤 10%) に貼り付け、過硫酸アンモニウムにて銅をエッチングし、グラフェン転写 PDMS 基板 (G/PDMS) を作製した。また、グラフェン転写のない PDMS 基板を比較のため準備した (PDMS)。作製した基板を足場としてヒト間葉系幹細胞 hMSC (Lonza 社 : PT-2501) の培養実験を行った。培地には、標準増殖培地 MSCGM (Lonza : PT-3001) および分化誘導培地 (MSCGM にレチノイン酸 (RA) 30 μM 含) を使用し、CO₂ インキュベータ (37°C) で 14 日間まで培養した。培養した基板は、DAPI で細胞核、ファロイジンで F-アクチンの染色を行った。また、免疫蛍光染色にて神経系細胞マーカーとなる MAP2、Tuj1、GFAP および nestin の発現を調べた。

【結果と考察】ラマン分光分析により、G/PDMS の表面にグラフェンが転写・付着していることが確認された。図 1 に、標準増殖培地 (-RA) および分化誘導培地 (+RA) にて培養したときの、DAPI の染色画像から計測した細胞核数 (細胞数) の結果を示す。培養日数とともに細胞数は増加した。G/PDMS と PDMS を比較すると、7 日目と 14 日目また -RA と +RA の何れにおいても前者の細胞数は多く、このことは PDMS 上のグラフェンの存在が細胞の増殖に効果をもつことを示している。免疫蛍光染色の結果、+RA だけでなく -RA においても、ニューロンマーカーである MAP2 や Tuj1 の発現が見られたことから、軟質な PDMS とグラフェンの組合せ構造がもつ hMSC の神経系細胞への分化誘導効果について、さらに検証を進めている。

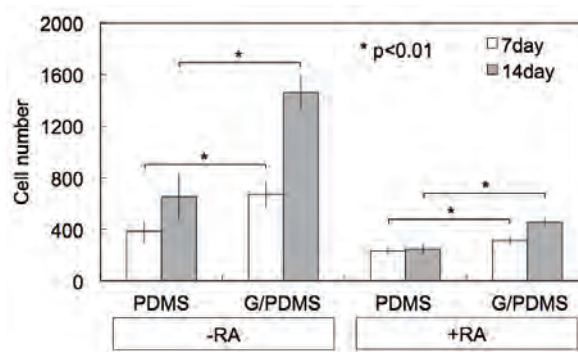


Fig.1 Cell number measurement results

文献

- 1) R. Kato, K. Tsugawa, Y. Okigawa, M. Ishihara, T. Yamada, M. Hasegawa, CARBON, 77 (2014) 823.
- 2) M. Ban, H. Sunada, M. Ishihara, M. Hasegawa, 27th European Conference on Biomaterials, Krakow, 2015, 551.

Culture of Human Mesenchymal Stem Cells by CVD Graphene Transferred PDMS Substrates

Masahito Ban^{1,2}, Ryota Shimoda², Masatou Ishihara³, Yuki Okikawa³, Masataka Hasegawa³

¹Department of Applied Chemistry, Nippon Institute of Technology

²Department of Innovative Systems Engineering, Nippon Institute of Technology

³Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Tel: +81-480-33-7724, E-mail: ban@nit.ac.jp

PDMS 製マイクロウェルチップを用いた iPS 胚様体培養

北九州市立大学 国際環境工学部
○宮本 大輔, 中澤 浩二

【緒言】

iPS 細胞が集合・凝集して形成する胚様体 (EB) は、幹細胞の初期分化を促す培養法として広く利用されている。また、iPS 細胞の分化特性は EB を取り巻く様々な内外因子 (液性因子、酸素、細胞間接着、力学的作用など) の影響を受ける。このような因子のなかでも、培養系内への溶解度が著しく低い「酸素」環境は、幹細胞特性を制御する重要な因子の一つといえる。

一方、我々は独自の EB 培養技術として、培養基板上に規則的に微小培養空間 (マイクロウェル) を多数設けたマイクロウェルチップを開発してきた。このチップ上に iPS 細胞を播種すると各ウェル内で自発的に EB が形成されることから、チップ全体では均質な EB を規則的に配置して培養することが可能である。

本研究では、材質の異なるマイクロウェルチップを用いて EB への酸素供給を変化させ、EB を取り巻く酸素環境の違いが iPS 細胞の分化特性に与える効果を評価した。

【実験】

酸素透過性の違いが幹細胞スフェロイド特性に与える効果を評価するため、酸素透過性が優れたポリジメチルシロキサン (PDMS) 基板上に数百マイクロ単位のウェル構造が規則的に設けられたマイクロウェルチップを作製した。このマイクロウェルチップをポリスチレン製培養皿上に置き酸素透過性が乏しいチップ条件 (Low- O_2 チップ) と同様の形状のチップをディッシュ底面が貫通し、PDMS 底面が露出することで酸素供給を促すチップ条件 (High- O_2 チップ) を作製した。この両チップにウェルあたり 1000 個の細胞密度で iPS 細胞を播種し、培養経過に伴う細胞挙動を評価した。

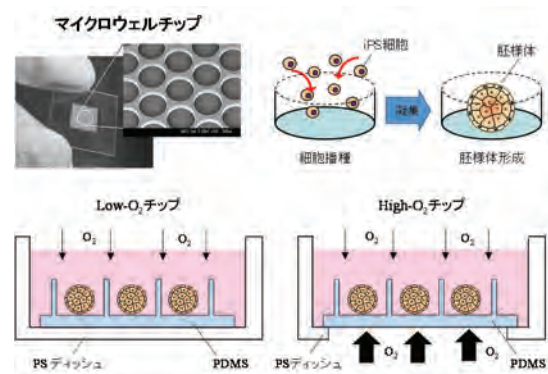


図 1. マイクロウェルチップにおける酸素供給の概念

【結果と考察】

まず両基板の酸素透過性を比較したところ、Low- O_2 チップに比べ High- O_2 チップは約 26 倍の酸素透過性を示した。各チップにおいて、培養 1 日目には直径約 $150 \mu\text{m}$ の EB が形成された。その後、培養経過に伴って EB が増殖したが、培養 7 日目における EB 増殖性を比較すると Low- O_2 チップ、High- O_2 チップの順となった。培養 7 日目における EB 内酸素濃度分布を低酸素プローブ (LOX-1) によって比較すると、Low- O_2 チップでは低酸素領域がみられたのに対し、High- O_2 チップでは低酸素領域はみられなかった。これらの結果は、培養系内への酸素供給能が細胞増殖能と密接に関わっていることを示している。

次に、培養 7 日目における各チップ条件の細胞分化マーカー遺伝子の発現を比較した。Low- O_2 チップでは肝細胞分化が促進されるのに対し、High- O_2 チップでは逆に血管細胞分化の発現が向上した。これらの結果は、EB を取り巻く酸素環境によって、細胞分化シグナル経路が変化する可能性を示している。

Embryoid Body Culture for iPS cells Using PDMS-type Microwell Chip

Daisuke MIYAMOTO, Kohji NAKAZAWA

Department of Life and Environment Engineering, The University of Kitakyushu

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

浮遊培養法による iPS スフェロイドの大量培養と機械的粉碎法による継代システムの開発

○植村 寿公^{1,2}、金 美花²、若林 真理²、上村 葉²、森田 健一²、津村 尚史²

¹大阪大学大学院工学研究科, ²(株)ジェイテックコーポレーション

【緒言】

再生医療、創薬分野での iPS 細胞の応用が期待されているが、実際の医療行為や創薬スクリーニングを考えた場合、 $10^8 \sim 10^{10}$ 個オーダーの細胞数が必要と考えられており、その実現や産業応用には通常のディッシュを用いた 2 次元培養では限界があり、種々の 3 次元培養の開発が試みられている。我々は、円筒シリンジ状のベッセル (図 (左)) を、軸を水平方向に回転し、細胞、細胞塊を浮遊培養させることによる 3 次元培養法 (CellFloat) の開発を進めており、軟骨構築等への応用を推進する一方、iPS 細胞などのスフェロイド培養への応用展開を進めている。iPS 細胞のスフェロイド培養においては、一定以上の大きさに育った iPS スフェロイドは分化がおりやすく、継代作業が必要になる。種々、継代法が考えられるが、我々は、シリンジタイプのベッセルを用いた増殖培養を用いている利点を生かし、閉鎖系のまま、シリンジから直接金属製メッシュフィルターを通し、物理的に小スフェロイド化し、次の培養につなげるシステム化を実現した。本報告では以上の詳細について報告する。

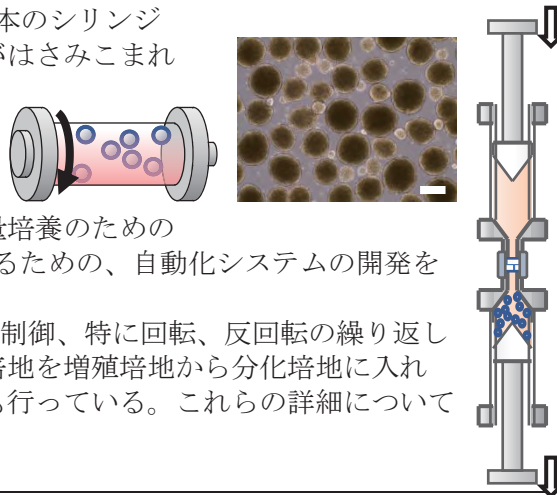
【実験】

iPS 細胞としては 253G1, 409B2 を、培地として AK02N, Essential8, RockInhibitor Y27632 (CultureSure; $10 \mu\text{M}$) を用いて、iMatrix コーティングディッシュ上で培養した後、EDTA による剥離の後、回転浮遊培養によるスフェロイド形成能を評価した。回転培養装置としてジェイテックコーポレーション社の CellPet-iPS, 培養ベッセルとして容量 10ml, 25ml, 50ml のガラスシリンジを用いて、評価した。細胞播種量、回転数、回転モード等の変化による効果を検証した。iPS スフェロイドの物理的粉碎は、シリンジの機構を利用して水圧をかけることにより、金属メッシュに通すことにより行った。回転浮遊培養、物理的粉碎による小スフェロイド化、回転浮遊培養、の繰り返しによる大量培養プロセスの検証を行った。

【結果と考察】

253G1, 409B2 細胞とも、iMatrix コーティングディッシュで 2 次元培養後、AK02N, Essential8 培地 (Y27632 添加) でスフェロイド形成 (直径 $100 \sim 200 \mu\text{m}$) が可能であった (図 (中央))。10ml, 25ml, 50ml での初期播種量は、50 万、120 万、250 万個程度が適切であり、回転数 $5 \sim 8 \text{ rpm}$ で、3 日間で増殖率 $3 \sim 4.5$ 倍程度であった。2 本のシリンジを、図 (右) のように金属メッシュ ($70 \mu\text{m}$) がはさみこまれたコネクタで結合し、コンピュータ制御により上から下に圧力をかけることにより、小スフェロイドを物理的に粉碎した。50ml のシリンジを用いて、小スフェロイドを下方のシリンジに回収し、回転浮遊培養を続けることにより、大量培養のためのプロセスを確立した。 10^8 個以上の iPS 細胞を得るための、自動化システムの開発を現在すすめている。

iPS 細胞の均質性も重要な項目であり、回転の制御、特に回転、反回転の繰り返しによるスフェロイドの大きさの均質性の制御、培地を増殖培地から分化培地に入れかえることによる、分化システムとしての開発も行っている。これらの詳細について報告する。



Mass Culture of iPS Spheroids by Cell Float System and Automatic Subculture System by Physical Grinding

Toshimasa Uemura^{1,2}, Meihua Jin², Mari Wakabayashi², Yo Uemura², Kenichi Morita², Takashi Tsumura²

¹Graduate School of Engineering, Osaka University ²JTEC CORPORATION

Tel/Fax: +81-6-6879-4973, E-mail: uemura@prec.eng.osaka-u.ac.jp

筋管細胞への分化時における細胞外マトリックスの作製と分化への影響

¹ 山形大学有機材料システム研究推進本部, ² 山形大学フロンティア有機材料システム創成フレックス大学院, ³ 物質・材料研究機構, ⁴ 山形県立米沢興譲館高等学校
○干場 隆志^{1,2,3}, 横山 夏海⁴

【緒言】

筋芽細胞が筋管細胞へと分化する際、筋芽細胞周囲の細胞外マトリックス(ECM)は、その組成を分化段階に応じて変化させる。しかしながら、このような ECM のリモデリングが筋芽細胞の分化にどのような影響を与えているかは、特に多数の構成物質の組織体として ECM が総合的にどのように作用しているかという点について解析が立ち遅れている。そのために生体外での ECM モデルが必要である。我々はこれまでに培養細胞により ECM を培養中に形成させ、細胞成分のみを選択的に除去(脱細胞化)した後、沈着した ECM を新しい培養基板として利用することで、新たな生体外 ECM モデルとして利用し、生物学的な解析に供してきた。そこで本研究では、筋芽細胞を筋管細胞へと分化誘導を行いながら培養することで、分化段階に応じた ECM を培養細胞により形成させ、その後、脱細胞化処理を行うことで、筋管細胞への分化時における ECM を分化段階的に模倣した培養基板、筋分化模倣型マトリックスの作製を試みた。また、筋分化模倣型マトリックスが筋管細胞への分化に与える影響についても評価した。

【実験】

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋芽細胞モデルとして用いて評価を行った。増殖培養には 10% ウシ胎仔血清含有 DMEM 培地を、分化誘導培養には 2%ウマ血清含有 DMEM 培地を用いて培養を行った。所定の条件および期間培養後、界面活性剤および核酸分解酵素による処理を行うことで脱細胞化処理を行い、筋分化模倣型マトリックスの作製を行った。その後、各種の評価を行った。

【結果と考察】

C2C12 細胞を、分化誘導培地で培養したところ、分化誘導 4 日目から細い筋管細胞が観察され初め、12 日目までに太く成熟した様子が観察された。一方、増殖培地中で培養した細胞では、分化誘導 4 日目においても筋管細胞は現れなかった。また 4 日目に分化初期マーカーである Myogenin 遺伝子の発現が一過的に観察され、12 日目には分化後期マーカーである Myosin heavy chain(MHC) 遺伝子の発現が検出された。以上の結果から、本研究では、分化誘導 4 日目を分化初期、12 日目を分化後期の細胞とした。また増殖培養 4 日目の細胞を未分化な細胞とした。さらに、これらの条件における細胞の ECM 遺伝子の発現パターンを調べたところ、分化段階に応じて変化することが確認された。このような細胞から脱細胞化処理により、筋分化模倣型マトリックスを作製した。

作製した筋分化模倣型マトリックス上で細胞増殖性を評価したところ、分化初期 ECM 上では細胞増殖が有意に抑制された。一方で筋分化については、分化初期 ECM 上で最も MHC 遺伝子の発現が高値であった(右図)。さらにメカニズムを調べるために筋分化を抑制する Id2 および Id3 遺伝子の発現を評価したところ、分化初期 ECM 上では Ids の発現が他の ECM 上より抑制されていた。以上の結果から、分化初期 ECM 上では筋分化を抑制する Ids の発現を抑制することにより筋分化を促進していることが示唆された。また筋分化模倣型マトリックスは筋分化時の ECM の役割を調べるための良いモデルになると期待された。

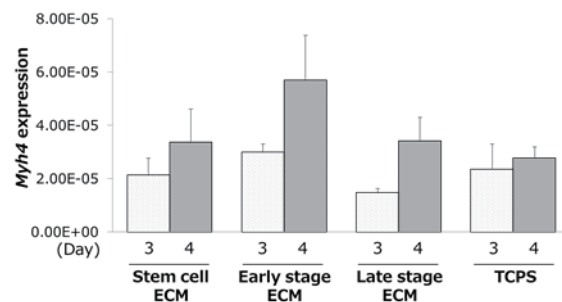


図:マトリックス上での MHC の発現

Preparation of stepwise myogenesis-mimicking matrices and their effects on myoblast maturation

Takashi Hoshiba^{1,2,3}, Natsumi Yokoyama⁴

¹Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, ²iFront, Yamagata University, ³National Institute for Materials Science, ⁴Yamagata Prefectural Yonezawa Kojokan High School

Tel: +81-238-26-3585, E-mail: thoshiba@yz.yamagata-u.ac.jp

Novel bioengineered surface design for the expansion of mesenchymal stem cells

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

○ Ajay SHAKYA, Eiji IMADO, Nguyen Kim PHUONG, Tamamo MATSUYAMA, Kotaro HORIMOTO, Isao HIRATA, Koichi KATO

[Introduction] Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells that can differentiate into bones, cartilages, fats and other cells of stromal origin. However, MSCs have limited proliferative capacity. The wide-spread application of MSCs in regenerative medicine may be limited by the lack of an established and efficient method to expand MSCs *in vitro*. Basic fibroblast growth factor (bFGF) is known to be effective for the maintenance of MSCs and is routinely added to the culture medium. We attempted to immobilize bFGF onto a glass substrate to develop a bioengineered culture substrate that serves for the selective and rapid expansion of MSCs, while retaining their stemness.

[Experiment] Recombinant bFGF with histidine-tag (bFGF-His) at the C-terminus was expressed in *E. coli* and purified by metal chelate chromatography. bFGF-His was then immobilized onto the glass surface previously functionalized with nitrilotriacetic acid (NTA) and Ni²⁺ ions. The immobilization is expected through the chelate linkage between NTA-Ni²⁺ and His-tag. The surface-immobilized bFGF was refolded *in situ* by exposing it to citrate buffer. Secondary structure of immobilized bFGF-His was analysed by solid-phase circular dichroism (CD) spectrometry. Human MSCs were cultured on the bFGF-His-immobilized surface to examine their proliferation and differentiation potentials.

[Result and Discussion] CD spectroscopy revealed that the immobilized bFGF, initially exhibited secondary structure rich in α -helix and that the spectrum was gradually transformed to exhibit the formation of β -strands upon exposure to citrate buffer solution, approaching to the spectrum of native bFGF. The rate of MSC proliferation was 1.6-fold higher on the bFGF-immobilized surface treated with *in situ* citrate buffer, compared to the untreated surface. It was shown that MSCs proliferated on the bioengineered surfaces retained potentials to differentiate into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages under specific differentiation medium.

Immobilized bFGF-His, which was subjected to *in situ* treatment with citrate buffer solution, seemed to be biologically active because its secondary structure approached its native state. This was well demonstrated by the cell culture experiments. MSCs, thus expanded, successfully differentiated into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages, demonstrating that they still retained stemness. These results led us to conclude that immobilization of bFGF on the culture substrate serves to enhance proliferation of MSCs.

1C-12

Novel bioengineered surface design for the expansion of mesenchymal stem cells

Ajay SHAKYA, Eiji IMADO, Nguyen Kim PHUONG, Tamamo MATSUYAMA, Kotaro HORIMOTO, Isao HIRATA, Koichi KATO

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

Tel: +81-82-257-5648, Fax: +81-82-257-5649, E-mail: drajayshakya@gmail.com, kokato@hiroshima-u.ac.jp

pH 環境が細胞膜ナノフラグメントの石灰化に及ぼす影響

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野,
○エミリオ サトシ ハラ¹, 岡田 正弘¹, 松本 卓也¹

【緒言】

我々はこれまでに、生体内における最初期石灰化過程の理解を目指し、分子細胞生物学・材料科学の二つの観点から研究を進めてきた。興味深いことに、細胞死によって形成される細胞膜状断片(ナノフラグメント)が石灰化の核となることを世界で初めて発見した(Hara ES, ACS Biomater Sci Eng, 2018)。さらに、従来の生細胞を用いた *in vitro* 石灰化は2~3週間程度かかるが、単離した細胞膜ナノフラグメントを用いた場合、わずか2~3日で石灰化を起こすことに成功した。しかし、そのナノフラグメントの石灰化環境について、まだ不明な点が多く残っている。そこで、本研究では、細胞膜ナノフラグメントの石灰化環境の理解を目指し、得た知見に基づいて *in vitro* ナノフラグメントの石灰化を制御することを目的とした。

【実験】

細胞膜ナノフラグメントの石灰化環境の理解のため、まず生後5日目から7日目のICRマウス大腿骨骨端部を採取し、マイクロCT、組織学的染色により最初期石灰化開始時期および部位を同定した。石灰化環境のpHに注目し、VisiSens pHイメージング用センサーシートを用いて大腿骨骨端部の石灰化前後のpHを測定した。次に、石灰化環境のpHを制御し、石灰化物の沈殿や成長にpHが及ぼす影響を検討した。次に、石灰化環境のpHを制御し、軟骨細胞の細胞外マトリックス形成能や軟骨細胞破裂にpHが及ぼす影響を検討した。最後に、培養した軟骨細胞から単離した細胞膜ナノフラグメントの石灰化誘導に環境のpHが及ぼす影響を検討した。

【結果と考察】

マイクロCT、組織学的染色より大腿骨骨端部の骨形成は生後6日目から開始することが分かった。最初期石灰化の前日にアルカリ性ホスファターゼの活性が認められ、石灰化環境のpH測定の結果、アルカリ性であることが分かった。次に、石灰化環境をアルカリ性に制御することで、石灰化物の沈殿(核形成)が多いこと、また石灰化物の成長が少ないことが分かった。また、石灰化環境をアルカリ性に制御することで、細胞外マトリックスの形成や軟骨細胞の破裂が促進された。最後に、石灰化環境をアルカリ性に制御することで、迅速なナノフラグメントの石灰化が認められた。これらの結果から、石灰化環境はアルカリ性であることが分かり、石灰化環境をアルカリ性に変調することで迅速な *in vitro* 石灰化が可能である。今後、迅速な *in vitro* 機能性骨組織の構築の技術開発が期待できる。

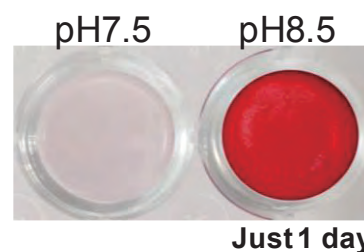


Fig.1.石灰化環境をアルカリ性に
変調することにより、迅速な細胞
膜ナノフラグメント石灰化が認
められた。

Effect of pH environment on cell membrane nanofragment mineralization

Emilio Satoshi Hara¹, Masahiro Okada¹, 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: gmd421209@s.okayama-u.ac.jp

フィブロイン基質上と人工材料モデル表面上との軟骨細胞の形態的比較

¹ 京都大学工学研究科, ² 京都大学工学部, ³ 京都大学ウイルス・再生医科学研究所, ⁴ 信州大学繊維学部

○建畠 祥司¹, 辰巳 朗¹, 平岩 倫², 有馬 祐介³, 玉田 靖⁴, 富田 直秀¹

【緒言】平方らは、蚕の繭から作製したフィブロインスポンジ上で軟骨細胞を培養すると、その表面上に重層化した軟骨細胞層が形成され、軟骨欠損部に貼り付けることで、層状構造を有する軟骨組織が早期に再生することを報告している。平面培養においてもフィブロイン基質上で軟骨細胞は脱分化せず増殖し、凝集体を形成することが報告されているが、その機序は未解明である。本研究では、表面性質が明確な人工材料モデルとして、メチル基(CH₃)、ヒドロキシ基(OH)、カルボキシ基(COOH)及びアミノ基(NH₂)を有するアルカンチオール自己組織化単分子膜(以下、SAM)を作製し、フィブロイン基質上における軟骨細胞の形態と各SAM上における形態を比較した。

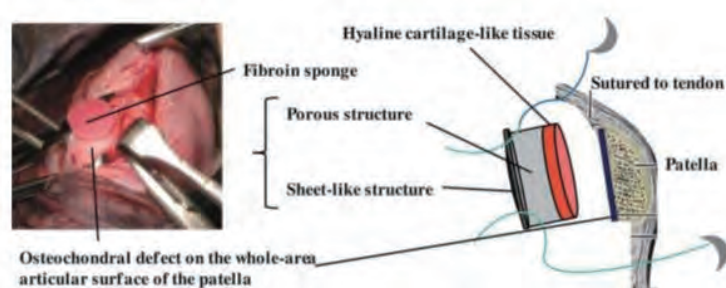


Fig.1. Cartilage repair using a fibroin sponge-based system was attempted for whole-area osteochondral defects of the rabbit patella.

【実験】金薄膜を蒸着したカバーガラス上にメチル基(CH₃)、ヒドロキシ基(OH)、カルボキシ基(COOH)及びアミノ基(NH₂)を有するアルカンチオールのSAMを形成させた。その後、各SAM及びフィブロインをコーティングさせたカバーガラスを24wellプレートに付着させ、各基質上に軟骨細胞を播種し、24時間のタイムラプス観察を行った。得られた画像より細胞位置座標及び細胞形状を抽出し、各基質上での細胞の面積、円形度及び凝集率をそれぞれ算出した。

【結果と考察】メチル基、ヒドロキシ基を有するSAM上において、フィブロイン基質と同様、細胞の平均面積が小さく円形度は高い値を取った。また、メチル基を有するSAMにおいてのみ、フィブロイン基質と同様、細胞の凝集率は高い値を取った。これらの結果から、メチル基を有するSAM上ではフィブロイン基質上と同様、軟骨細胞は分化形質を維持し細胞凝集体を形成する可能性が考えられる。今後フィブロインとメチル基を有するSAM上における細胞層の形成や、細胞挙動の類似性についてさらなる精査を行い、材料表面における細胞層形成とその再生医療への応用可能性を検討する予定である。

Morphological comparison chondrocytes on fibroin substrate and chondrocytes on artificial material model

Shoji Tatehata¹, Akira Tatsumi¹, Rin Hiraiwa², Yusuke Arima³, Yasusi Tamada⁴, Tetsuji Yamaoka¹

¹Graduated school of Engineering, Kyoto University, ²Undergraduated school of Engineering, Kyoto University, ³Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, ⁴Faculty of Science and Technology, Shinshu University

Tel: +81-75-383-3642, Fax: +81-75-383-3642, E-mail: tatehata.shoji.55w@st.kyoto-u.ac.jp

IVT-mRNA を利用した目的の成長因子を分泌する細胞シート作製の検討

¹東京女子医科大学 先端生命医科学研究所, ²Ewha Womans University, College of Pharmacy,³ 早稲田大学 理工学術院
○秋山義勝¹, Hyo Kyoung KWON², 原口裕次¹, 坂口勝久³, 大和雅之¹, Hyukjin LEE², 清水達也¹

【緒言】 温度応答性細胞培養表面で作製した心筋細胞シートを積層化し、これを微小流路付きコラーゲンゲル上で流路内に培地を灌流しながら培養を行うことで、積層化心筋細胞シートに血管網を誘導、形成させることに成功し、厚い組織構造を壊死させることなく長期に培養できることを報告してきた。血管網の誘導、形成には心筋細胞シート内に含まれる血管内皮細胞と培地中の成長因子が重要な役割を果たすことを見出している。一方、近年、*in vitro* transcription (IVT) 法で作製した mRNA が遺伝子導入法として注目を集めている。非ウイルス系ベクターを利用した場合と比べ、細胞質内での mRNA からの迅速なタンパク質翻訳と発現、短時間での分解、さらには細胞核内への局在の可能性が極めて低いことから、ゲノム DNA への挿入変異が起こりにくい点が挙げられ、安全性の高い遺伝子導入法として期待が寄せられている。本研究では、細胞シートの生体への移植や灌流培養系において、血管網の誘導、構築を加速化させることを目的に、成長因子分泌型の細胞シートの作製について検討した。具体的には、IVT 法により作製した mRNA を利用し、これを用いて新生児仔ラットの心臓から採取した心筋細胞にヒトの血管内皮細胞増殖因子 (VEGF A165) を遺伝子導入し、目的タンパク質の発現について評価した。

【実験】 温度応答性細胞培養表面に新生児仔ラットの心臓からコラゲナーゼ処理によって採取した細胞を予めウシ血清で処理した組織培養ポリスチレン表面 (12 well) あるいは温度応答性細胞培養表面 (12 well) にコンフルエント状になるように播種した。eGFP もしくは VEGF A165 をコードするプラスミド DNA から、IVT 法によって目的の mRNA を作製した (eGFP-mRNA および VEGF-mRNA)。作製した mRNA を市販の遺伝子キャリアー (Lipofectamine 2000) を用いて、4 日間培養した心筋細胞の培地に mRNA (1.5 μg) を添加し、遺伝子導入を行った。その後、蛍光顕微鏡観察による培養細胞の観察や細胞培養した培地中の VEGF 量を ELISA によって定量し、遺伝子導入による培養細胞への影響について評価した。

【結果と考察】 eGFP-mRNA の添加 24 時間後、蛍光顕微鏡で eGFP の発現状態を観察した。比較のために 293FT 細胞にも同様な方法で eGFP-mRNA の導入を行った。遺伝子導入した 293FT 細胞では、eGFP 由来の蛍光が観察された。しかし、心筋細胞では導入した mRNA の種類に関係なく eGFP の発現を確認することができなかった。一方、ELISA 法によって VEGF-mRNA 導入後の V 培地中の VEGF の変化量について評価した。VEGF-mRNA を導入しなかった心筋細胞の培地 (Table 1, Control) では、微小な VEGF 量の増加を認めたが、VEGF-mRNA を添加、導入した心筋細胞の培地では顕著な VEGF 量の増加を確認した (Table 1)。導入後 1 日目 (Day 1) では、17.5ng/ml の VEGF 量の増加を認め、導入後 3 日後 (Day 3) まで、顕著な VEGF 量の増加を確認した。これらの結果から、初代心筋細胞内に VEGF-mRNA が取り込まれ、細胞内で翻訳され、最終的には VEGF として培地中に分泌されたと考えられる。また Day 3 まで顕著な VEGF 量の増加が確認できたことから、導入した VEGF-mRNA は 3 日間程度の期間、タンパク質発現のための機能することが示唆された。

Table 1 培養日数ごとの培地中 VEGF の増加量

	Day1	Day2	Day3	Day4
VEGF-mRNA	17.5	5.5	12.1	0.0
Control	0.2	0.3	0.3	0.4

*Unit: ng/ml

Fabrication of cells-sheet secreting targeted growth factor by using IVT-mRNA

Yoshikatsu AKIYAMA¹, Hyo Kyoung KWON¹, Yuji HARAGUCHI², Katsuhisa SAKAGUCHI¹, Masayuki YAMATO¹, Hyukjin LEE², Tatsuya SHIMIZU¹

¹ Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, ²Ewha Womans University, College of Pharmacy, ³ Faculty of Science and Engineering, Waseda University, TWIns Tel: +81-3-3353-8112, Fax: +81- 3-3359-6046, E-mail: akiyama.yoshikatsu@twmu.ac.jp

電荷を有する高分子基板への細胞の初期接着機構の解析

¹ 山形大学有機材料システム研究推進本部, ² 山形大学フロンティア有機材料システム創成フレックス大学院, ³ 物質・材料研究機構, ⁴ 京都大学化学研究所
 ○干場 隆志^{1,2,3}, 吉川 千晶³, 榊原 圭太⁴

【緒言】

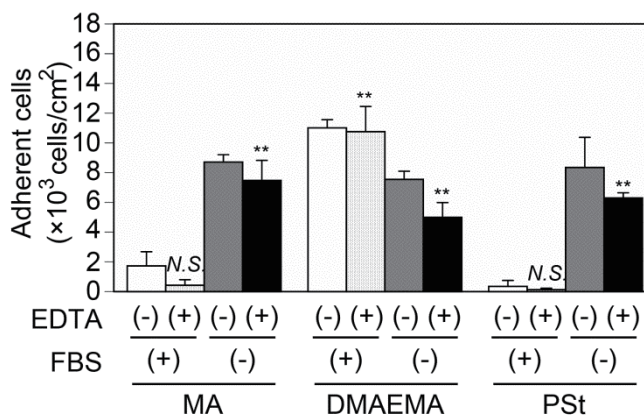
培養基板への細胞の接着は、細胞の増殖や生存、形態、分化など様々な機能を制御しているため、その制御は重要である。細胞の接着を促進するために、これまで様々な方法が開発されてきたが、培養基板を、電荷を有する高分子で被覆する方法もよく用いられている。従来は、細胞膜が帯びている電荷との静電的相互作用や、培養基板への接着性タンパク質の吸着が促進されることにより、細胞の接着が促進されると理解されてきた。一方で、細胞膜は負に帯電すると考えられているが、培養用ポリスチレンのような負電荷を有する高分子上でも細胞は無血清培地中で接着することができる。そのため、我々は電荷を有する高分子基板上への細胞の接着挙動の再解析が必要なのではないかと考えた。そこで、このような基板上への細胞の初期接着挙動および接着機構の細胞生物学的手法を用いた再解析を試みた。

【実験】

負電荷を有する高分子としてメタクリル酸(MA)共重合体、正電荷を有する高分子としてメタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチル(DMAEMA)共重合体を用い、未処理ポリスチレン(PS)基板にキャスト法にて塗布し、培養基板を作製した。その後、線維肉腫細胞株である HT-1080 細胞および子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞を用いて細胞接着実験、EDTA あるいはヘパリンを用いた細胞接着阻害実験、Single cell force spectroscopy を行った。

【結果と考察】

HT-1080 あるいは HeLa 細胞の初期接着挙動を評価したところ、血清培地中では DMAEMA>MA>PS の順に多く細胞は接着した。一方、無血清培地中ではどの基板上へも細胞接着は 5 分以内に生じていた。さらに、Single Cell Force Spectroscopy により基板への細胞接着力を測定したところ、無血清培地中では、MA>DMAEMA>PS の順に接着力は弱くなったが、血清培地中では DMAEMA>>MA、PS と大きな違いが見られた。また、無血清培地中の方が血清培地中よりも細胞接着力は総じて大きかった。さらに細胞接着機構を確認するために、インテグリン依存的な細胞接着を阻害する EDTA を添加したところ、無血清培地中では細胞接着は抑制されなかった。血清培地中では、MA 上へ細胞接着は完全に阻害された一方、DMAEMA 上への接着は完全には阻害されなかった(右図)。血清培地中での DMAEMA への細胞接着はヘパリン硫酸の 1 種であるヘパリンにより阻害された。この結果は血清培地中において、DMAEMA 上ではインテグリンを介在せず、他の膜タンパク質レセプターにより細胞が接着していることを示唆している。以上の結果より、電荷を有する高分子基板上への細胞の接着は従来考えられているよりも複雑であると考えられた。



Analysis of initial cell adhesion mechanisms on charged polymer substrates

Takashi Hoshiba^{1,2,3}, Chiaki Yoshikawa³, Keita Sakakibara⁴

¹Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, ²iFront, Yamagata University, ³National Institute for Materials Science, ⁴Institute for Chemical Research, Kyoto University

Tel: +81-238-26-3585, E-mail: thoshiba@yz.yamagata-u.ac.jp

外側性の垂直的骨造成モデルを用いた新生骨の多面的評価

¹大阪大学大学院歯学研究科 クラウンブリッジ補綴学分野, ²大阪大学大学院工学研究科 マテリアル生産科学専攻, ³東北大学大学院歯学研究科 分子・再生歯科補綴学分野
○畔堂 佑樹¹, 萱島浩輝¹, 石本 卓也², 中野 貴由², 江草 宏³, 矢谷 博文¹

【緒言】

細胞、足場、成長因子を用いて、失われた歯槽骨を再生する歯槽骨造成技術は、審美的および機能的な補綴歯科治療において有用な手法である。歯科領域における骨造成の特徴としてあげられる、歯槽骨に対して外側に造成を行う外側性垂直的骨造成は、術後吸収や長期安定などの課題を有する非常に難易度の高い技術である。これらの課題を克服すべく、細胞、足場、成長因子の各分野において、安全かつ確実な骨造成技術の確立に向けた開発研究が活発に行われている。しかしながら、これまでに報告のある垂直的造成骨の評価モデルはサイナスリフトや欠損部に填塞する内側性の骨造成の評価がほとんどであり、外側性の骨造成に関する報告はほとんどない。また、近年、骨の新たな評価基準として骨質が注目を集めており、これまでの造成骨の評価方法である組織学的評価およびエックス線解析とは異なる新たな知見が得られることが期待されている。そこで本研究では、CAD/CAMにより作製したドームおよびβ-TCP 骨補填材を用いて外側性の垂直的骨造成を行い、骨質の評価を含めた造成骨の多面的評価を行うことを目的とした。

【実験】

垂直的骨造成にあたり、CAD/CAMにて直径6 mm、高さ3 mmの半球状に設計したチタン製ドーム（以下Tiドーム）を製作した。ラット頭蓋骨に5 mm径の欠損を形成し、β-TCPを補填したTiドームを欠損上に固定後、完全に閉鎖し、術後2週、8週、16週で頭蓋骨サンプルを取り出した。各試料はマイクロCT解析にて骨の新生量および補填材の残留位置を確認し、母床骨から造成骨の高さを測定した。さらに造成骨の体積、骨塩量、骨密度を測定した。また、組織切片を作製後、HE染色にて新生骨の評価を行うとともに、偏光顕微鏡を用いて新生骨のコラーゲンの配向性を観察し、骨質の評価を行った。さらにTRAP染色にて破骨細胞を観察した。

【結果と考察】

マイクロCT解析の結果、造成骨の高さは2週間から8週間にかけて有意に減少し、その後16週間において高さは増加傾向を示した。骨体積も高さと同様の傾向を示したが、骨塩量、骨密度は時間とともに増加傾向を示した。HE染色の結果、時間経過とともにTiドーム内のβ-TCPは、その周囲を細胞に取り囲まれつつ、新生骨に置換されている様子が観察され、Tiドームに沿った垂直的な新生骨形成が認められた(Fig. 1)。さらに、偏光顕微鏡観察の結果、Tiドーム周囲の新生骨は、Tiドーム形態に沿ってコラーゲンが規則的に配向する傾向を認めた。その一方、造成骨内部では規則的なコラーゲン配向は認めなかった。TRAP染色の結果、β-TCP周囲に破骨細胞を認め、適切な骨置換が行われている可能性が示唆された。

以上の結果より、Tiドームとβ-TCPを用いることで、外側性の垂直的骨造成が可能であることが明らかとなった。また、造成される新生骨においてはTiドームに沿って規則的なコラーゲンの配向が形成される可能性が示唆された。この造成モデルは補填材や成長因子の評価といった、外側性の垂直的骨造成技術のさらなる多面的な評価に有用であり、さらにはドーム形態をはじめとする新生骨の骨質に対する新たな知見を得られることが期待される。

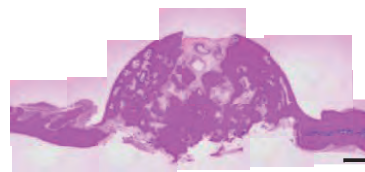


Fig.1 The extra-vertical bone augmentation (16 weeks)

Biomaterials: The multi-evaluation of extra-vertical bone augmentation with CAD/CAM dome

Yuki Bando¹, Hiroki Kayashima¹, Takuya Ishimoto², Takayoshi Nakano², Hiroki Egusa³, Hirofumi Yatani¹

¹Department of Fixed Prosthodontics, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

²Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan

³Division of Molecular and Regenerative prosthodontics, Tohoku University Graduate School of Dentistry

Tel: +81-66-879-2946, Fax: +81-66-879-2947, E-mail: yuki_bando@dent.osaka-u.ac.jp

iPS 細胞の多能性維持培養のための bFGF 徐放性高分子シート

¹産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門, ²産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門,

³片山化学工業株式会社

○大矢根 綾子¹, 中村 真紀¹, 荒木 裕子¹, 樋口 久美子², 伊藤 弓弦², 安達 昌城³

【緒言】繊維芽細胞増殖因子-2 (bFGF) はヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞、ES 細胞等) の多能性維持培養に必須の培養液添加剤である。しかし、安定性に劣る bFGF の有効濃度維持のための頻回 (通常 1 日 1 回) な培養液交換が、コスト増加要因となっている。近年、多能性幹細胞の培養液交換頻度を低減するための添加剤として、bFGF 徐放機能を有する乳酸-グリコール酸共重合体マイクロビーズが上市された。しかし、同ビーズは培養液中で沈降して細胞に接触する上に生分解性を示すことから、その分解生成物や接触による物理刺激が細胞に何らかの影響を与える懸念がある。そこで本研究では、培養液よりも比重の小さい非分解性のポリエチレン不織布に bFGF を吸着させることで、細胞非接触型の bFGF 徐放性高分子シートを創製し、iPS 細胞の多能性維持培養に対する有効性を評価した。

【実験】ポリエチレン不織布 (タイベック、旭・デュポンフラッシュスパンプロダクツ製) を大きさ 10 mm × 10 mm のシートに切り出し、酸素プラズマ処理により表面を親水化した。種々の濃度 (0, 1, 2, 4, 8, 12 μg/mL) で bFGF を溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (以後、吸着液) 1 mL に PE シートを浸漬し、25°C で 24 時間振盪させた後、洗浄した。同処理されたシートの bFGF 徐放性を評価するため、細胞を含まない培養液 (Essential 6 Medium、Thermo Fisher Scientific 製) 2 mL にシートを添加し、1、2、3 日後の培養液中の bFGF 濃度を ELISA で測定した。さらに、iPS 細胞の多能性維持培養に対する有効性を評価するため、ヒト iPS 細胞 (201B7 株、理化学研究所バイオリソースセンター) を 1 日前培養した後、上記シートを添加した培養液中で、培養液交換を行わずに 3 日間培養した。継代後同様の培養を繰り返し、最大 8 日間の細胞培養を行った。比較対照として、通常の bFGF (10 ng/mL) 添加培養液 (毎日交換) 中でも培養を行った。培養後の細胞の形態を位相差顕微鏡により観察した。また、培養後の iPS 細胞に対し、rBC2LCN レクチン染色および蛍光標識抗体 (Nanog、Oct3/4) 染色による多能性評価を行った。

【結果と考察】ELISA による分析の結果、吸着液の初期 bFGF 濃度の増加に伴い、シートへの bFGF 吸着量ならびに培養液中への bFGF 放出量が増大することが確認された。吸着液の初期 bFGF 濃度 8 μg/mL 以上の条件では、培養液中の bFGF 濃度を 3 日間にわたって 10 ng/mL 以上に保持することができた。

bFGF 濃度 12 μg/mL の吸着液で作製されたシートを用い、ヒト iPS 細胞の培養実験を行った。形態観察の結果、シートを添加した培養液 (交換無し) 中でも、通常の培養条件と同様に細胞が増殖し、正常な形態のコロニーを形成することが分かった (右図)。また、レクチンおよび抗体染色の結果、いずれの条件で培養されたヒト iPS 細胞も、未分化性マーカー (rBC2LCN、Nanog、Oct3/4) の発現維持が確認された。これらの結果から、bFGF に替えて bFGF 徐放性シートを培養液に添加することで、毎日の培養液交換を行わなくても、ヒト iPS 細胞の多能性維持培養を行えることが確認された。

以上、本 bFGF 徐放性高分子シートは、iPS 細胞の多能性維持培養のための細胞非接触型の添加剤として有用と期待される。

【謝辞】本研究の一部は、JST マッチングプランナープログラムにより実施された。

bFGF-Releasing Polymer Sheet for the Maintenance Culture of iPS Cells

Ayako Oyane¹, Maki Nakamura¹, Hiroko Araki¹, Kumiko Higuchi², Yuzuru Ito², Masaki Adachi³

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

²Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, AIST, ³Katayama Chemical

Tel: +81-29-861-4693, Fax: +81-29-861-3005, E-mail: a-oyane@aist.go.jp

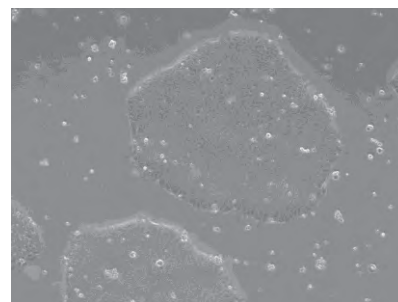


図 bFGF 徐放性シート添加培養液で培養されたヒト iPS 細胞

1D-01

ハイドロキシアパタイト核処理 PEEK の生体活性評価

1 京都大学大学院 整形外科、2 京都大学大学院 エネルギー科学研究科

○正本和誉¹、藤林俊介¹、藪塚武史²、昼田智子²、大槻文悟¹、清水孝彬¹、奥津弥一郎¹、河井利之¹、後藤公志¹、石崎千尋²、松田秀一¹

【緒言】

polyetheretherketone (PEEK)はすでに広く医用応用されているが、臨床成績を高めるためには、PEEK に対して骨結合能を付加する必要がある。その方法について、すでに多くの報告があるが、高温処理に伴う PEEK 特性の変化や、高い処理コストなどの問題があった。これを克服すべく、濃硫酸への浸漬(S)、グロー放電処理(P)、アモルファスリン酸カルシウムの析出(A)の 3 つの工程からなるハイドロキシアパタイト核処理法を共同研究者らが報告した(Yabutsuka T, *Mater Sci Eng C*. 2017)。今回その生体活性を *in vivo* と *in vitro* の両面から評価した。

【実験】

板状(15mm×10mm、厚み 2mm)及びディスク状(直径 18mm、厚み 2mm) PEEK に対して処理なし(N)、濃硫酸処理+グロー放電(SP)、SP にアモルファスリン酸カルシウムを析出(SPA)した 3 群を用意した。①*in vivo*:日本白色家兔(オス、2.8kg)の脛骨に板状 PEEK を挿入し、4、8、16 週後に sacrifice し、引き剥がし試験(各 n=6)と、組織標本(各 n=3)による bone-implant contact (BIC)を測定した。②*in vitro*:MC3T3-E1 細胞をディスク状 PEEK に 1.0×10^4 cells/cm² で播種し、day4 での細胞生存性を XTT assay で測定した。統計学的有意差検定には *in vivo* 試験で paired-*t* test を、*in vitro* 試験で one-way ANOVA を用い、*p*<0.05 を有意とした。

【結果と考察】

①引き剥がし試験、組織試験では preliminary 試験の結果、SP 群で骨結合がほとんど得られなかったため、動物愛護の観点から N 群と SPA 群のみ行った。引き剥がし試験の各 failure load は N 群、SPA 群の順に 4 週(1.0N 対 12.2N)、8 週(2.9N 対 23.4N)、16 週(1.7N 対 25.3N)で、いずれも SPA 群が N 群に対して有意に大きな値を示した。組織標本の BIC は N 群、SPA 群の順に 4 週(10.4%対 52.5%)、8 週(19.5%対 55.9%)、16 週(26.8%対 56.0%)で、同様にいずれでも SPA 群が N 群に対して有意に大きな値であった。②XTT assay の測定値を N 群の値を 1.0 とした相対値で表すと、N 群、SP 群、SPA 群の順に(1.0、1.1、1.6)で、SPA 群が N 群、SP 群に対して有意に大きな値を示した。ハイドロキシアパタイト核処理が PEEK に対して優れた骨結合能を与えることがウサギの動物実験により示された。また、XTT 試験の結果により、ハイドロキシアパタイト核処理は骨芽細胞系への毒性はないことが示された。

Bioactivity of Hydroxyapatite Nuclei on PEEK

Kazutaka MASAMOTO^{a*}, Shunsuke FUJIBAYASHI^a, Takeshi YABUTSUKA^b, Tomoko HIRUTA^b, Bungo OTSUKI^a, Yaichiro OKUZU^a, Koji GOTO^a, Takayoshi SHIMIZU^a, Yu SHIMIZU^a, Chihiro ISHIZAKI^b, Keito FUKUSHIMA^b, Toshiyuki KAWAI^a, Shuichi MATSUDA^a

a Department of Orthopedic Surgery, Kyoto University, Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

b Department of Fundamental Energy Science, Graduate School of Energy Science, Kyoto University

Phone:+81757513362;Fax:+81757518409 Email:masaoto@kuhp.kyoto-u.ac.jp

人工股関節置換術後無菌性ゆるみにおける IL-27 の骨溶解抑制機能

¹北海道大学大学院医学研究院 整形外科学教室

○高橋 大介¹, テルカウイ アラー¹, 松前 元¹, 田 園¹, アルハサン ヘンドゥ¹,
濱崎 雅成¹, 岩崎 倫政¹

【緒言】

インプラント周囲の無菌性ゆるみは人工股関節置換術後の主な合併症の一つである。その主原因である骨溶解は、人工関節摺動面で発生したポリエチレン摩耗粉にマクロファージが反応し、炎症誘発性のサイトカインやケモカインが放出されることで発生する。新しく開発されたビタミンE添加超高分子量ポリエチレン(以下、VE-UHMWPE)ライナーは従来のライナーと比較して細胞反応性が低く、良好な長期臨床成績が期待される。しかし、VE-UHMWPE 摩耗粉が骨吸収を低下させるメカニズムに関しては不明な点が多い。本研究の目的は、VE-UHMWPE 摩耗粉に対するマクロファージの反応に関連した抗炎症メカニズムについて解析することである。

【実験】

①ヒトマクロファージと UHMWPE 摩耗粉との共培養モデル (VE-UHMWPE と従来 UHMWPE の比較) において転写プロファイリングを行い、候補遺伝子を探索した。②マウス骨粗鬆症頭頂骨モデルを用いて候補遺伝子の機能解析を行った。

【結果と考察】

共培養モデルの転写プロファイリングでは、抗炎症関連遺伝子の増加を認めた。特に IL-27 は、従来の UHMWPE と比較して著明に上昇を認めた。マウス骨粗鬆症頭頂骨モデルにおける骨吸収領域は、遺伝子組み換え IL-27 の局所投与により骨吸収が抑制された。また同部位における破骨細胞数が著明に低下していた。同様に、単球培地において IL-27 を添加したところ、破骨細胞への分化と骨吸収能の低下を認めた。

本研究は、VE-UHMWPE に対するマクロファージ反応における IL-27 の関連性及び IL-27 の骨吸収抑制機能に関する初めての報告である。今後我々は、ポリエチレン摩耗粉により惹起される骨吸収に対する新規治療薬開発に向けて研究を進めていく予定である。

Gene profiling of macrophages stimulated by orthopedic implants debris identifies IL-27 as potent regulator of osteolysis

Daisuke Takahashi¹, Alaa Terkawi¹, Gen Matsumae¹, Tian Yuan¹, Hend Alhasan¹, Masanari Hamasaki¹, Norimasa Iwasaki¹

¹ Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University,

Tel: +81-11-706-59365, Fax: +81-11-706-6054, E-mail: rainbow-quest@pop02.odn.ne.jp

The crucial role of neutrophils in resolution of inflammation elicited by polyethylene debris of orthopedic implants

¹Department of Orthopedic Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine

○M Alaa Terkawi¹, Hend Alhasan¹, Gen Mastumae¹, Daisuke Takahashi¹, Norimasa Iwasaki¹

【Objective】

Aseptic loosening due to inflammatory osteolysis is the most common mode of arthroplasty failure with an increasing incidence in both elderly and younger populations. Wear debris derived from bearing surfaces materials of implant during the motion of the joint has been implicated as the primary cause of periprosthetic osteolysis. They trigger excessive inflammatory response that promotes bone resorption at the site of implant resulting in mechanical instability of prosthetic components. Despite the fundamental roles of neutrophils in the pathogenesis of a broad range of inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis, their contribution to in the pathogenesis of osteolysis has never been investigated. Therefore, the objective of this study was to explore potential contribution of neutrophils to pathophysiology of osteolysis.

【Methods】

To this end, an in vitro model was developed for culturing human neutrophils with particulate debris of implant bearing materials of conventional cross-linked ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) and vitamin E-blended UHMWPE (VE-UHMWPE). Cells were harvested after 2 hours of culture for gene expression analysis and transmission electron microscopic examination. Thereafter, the effects of an in vivo depletion of neutrophils were examined using murine calvarial osteolysis model. Mice were injected with mAb Ly6G on days -1, 2, and 5, and particulate debris was implanted on their calvariae for 7 days. calvariae were collected for micro-computed tomography assessment (μ CT) and histopathological examinations. Moreover, serum cytokines levels were examined by ELISA and cell population of spleen was assayed by flow cytometry.

【Results and conclusion】

Our results demonstrated that both UHMWPE and VE-UHMWPE particles stimulated human neutrophils to upregulate both pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators. Neutrophils cultured UHMWPE particulate debris exhibited morphologic characteristics including ingested debris within the phagolysosomes and irregular shapes of cells with cytoplasmic processes. These results revealed that polyethylene particle debris can activate neutrophils in vitro. Furthermore, neutrophil-depleted mice exhibited greater osteolytic lesions with increased TRAP-positive staining areas than those of control antibody-treated mice. Likewise, gene expression of osteoclasts markers was significantly elevated in the calvarial tissues of neutrophil-depleted mice as compared to these in control antibody-treated mice. These data provide an important clue about the involvement of neutrophils in osteolysis and suggest a possible regulatory role in resolution of inflammation triggered by implant debris. Such data imply that patients with neutrophils disorders such as neutropenia might be more susceptible for osteolysis.

The crucial role of neutrophils in resolution of inflammation elicited by polyethylene debris of orthopedic implants

M Alaa Terkawi¹, Hend Alhasan¹, Gen Mastumae¹, Daisuke Takahashi¹, Norimasa Iwasaki¹

¹Department of Orthopedic Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine

Tel: +81-011-706-9026, Fax: +81-011-706-6054, E-mail: materkawi@med.hokudai.jp

Vitamin-E 混合ポリエチレンの低摩耗・高摩擦力に対する実験的考察

¹京都大学 工学研究科機械理工学専攻, ²京都大学 工学研究科マイクロエンジニアリング専攻
 ○大津 陽平¹, 檜垣 誠妥¹, 波多野 直也¹, 三上 慎司¹, 大津 達也¹, 松本 充弘¹,
 河野 大輔², 松原 厚², 富田 直秀¹

【緒言】人工関節界面で見られるような粘性流体を介する粘弾性体の摺動では、摩耗量と摩擦力の間に必ずしも正の相関があるとは限らない。実際に、超高分子量ポリエチレン（以下 UHMWPE）にビタミンEを混合することによって、Co-Cr-Mo合金を相手面とした pin-on-disc 往復動摩擦試験において、摩耗量は減少するが、摩擦力は増加する結果が報告されている。本研究では、起動時における摩耗に着目し、粘性の影響を最小化して摺動界面における分子切断の程度を予測する新しい指標 Destruction Energy Index (以下 DEI) を提案し、摺動界面における分子切断に及ぼすビタミンE混合の影響を考察した。

【実験】起動時に摩擦摺動界面に生じる微小変位を、粘弾性を有する1本の剛毛によってモデル化し、弾性部分に加わる力がある限界値に至ると剛毛は破断し、この瞬間を起動時と定義した。このとき、潤滑液粘度が上記モデルにおける粘性項にしか影響を与えないという仮定の下、潤滑液粘度のみを変えて静止摩擦試験を実施した。潤滑液には3種類のシリコンオイル(粘度:10, 100, 1000 cSt)を用い、粘度変化による差が最小となる起動変位を設定した。また上記モデルから、DEI は起動摩擦力の弾性要素と起動変位の積の半値で定義される。試料にはビタミンE混合と Virgin の UHMWPE (ナカシマメディカル社製) を直径5mmの円柱状に加工したものを、摩擦相手面として Co-Cr-Mo合金を用い、垂直面圧 3.14 MPa 負荷下で6パターンの荷重速度により引張を付与した。また荷重速度を 0 N/s に外挿することで DEI を推定した。

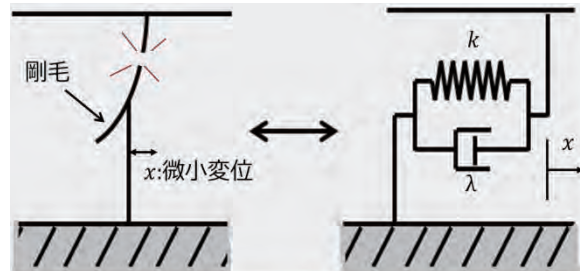


Figure 1 Schematic drawings of the friction model

【結果と考察】得られた DEI は Virgin 試料で 157.2 μJ , ビタミンE混合試料で 96.82 μJ と後者の方が小さい。この結果からビタミンE試料の方が Virgin 試料よりも起動時の粘性抵抗割合が大きく、そのために起動抵抗に対して摩耗粉の生成が比較的少ない可能性が考えられる。ただし、起動摩擦力の荷重速度に対する増加率が、ビタミンE配合・Virgin 試料の両者でほぼ等しいことから、UHMWPE 自体の粘性変化の影響は少ないと考えられる。

Experimental consideration for low wear and high friction force of Vitamin-E blended polyethylene
 Yohei Ohtsu¹, Masaya Higaki¹, Naoya Hatano¹, Shinji Mikami¹, Tatsuya Ohtsu¹, Mitsuhiro Matsumoto¹,
 Daisuke Kono², Atsushi Matsubara², Naohide Tomita¹

¹Department of Mechanical Engineering and Science, Kyoto University

²Department of Micro Engineering, Kyoto University

Tel: 075-383-3642, Fax: 075-383-3642, E-mail: ootsu.youhei.52n@st.kyoto-u.ac.jp

骨再生足場としての生分解性コアセルベート液滴-炭酸アパタイト複合カプセルの調製

¹東理大院基礎工・²阪大院工

○小松周平¹・池戸佑依¹・三田北斗¹・麻生隆彬²・石原量¹・菊池明彦¹

【緒言】骨粗鬆症は、海綿骨の骨密度の低下により骨折を引き起こす。現在、ヒドロキシアパタイト焼結体などを用いた骨欠損修復及び骨再生のための治療が行われており、高骨転換能を有する材料を用い、非侵襲的な治療方法が望まれる。また、骨形成因子などの薬物を担持・放出できれば、骨再生材料として魅力的である。そこで我々は、生体適合性を示し、低 pH 条件下で溶解可能な炭酸カルシウム (CaCO_3) と骨転換能を有する炭酸アパタイト (CO_3Ap) を組み合わせた、有機-無機ハイブリッド粒子に注目した。当研究室では、2-methylene-1,3-dioxepane (MDO) と 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) の共重合により、疎水性低分子などを内包可能なコアセルベート液滴を形成する生分解性温度応答性高分子 poly(MDO-co-HEA) を合成してきた。この液滴表面に CaCO_3 の固体微粒子を付着させピッカリングエマルジョンを作製し、その後、炭酸カルシウムを結晶成長することで CaCO_3 をシェルに、薬物担持可能なコアセルベート液滴をコアに持つコア-シェルカプセルを調製可能であると考えられる。さらに、 CaCO_3 のシェルをリン酸化し、 CO_3Ap にすることで、骨転換能を付与できると考えられる。本研究では骨再生をめざした骨転換能、薬物内包能、海綿骨類似構造を持つ有機-無機ハイブリッドカプセルの調製を目的とした。

【実験】合成した poly(MDO-co-HEA) 水溶液 1.0 mL に固体微粒子として CaCO_3 20 mg、1.0 mol/L CaCl_2 1.0 mL、Rhodamine B 1 mg/L を加え、30°C、2.5 h 攪拌し、ピッカリングエマルジョンを調製した。次に CO_2 雰囲気下でピッカリングエマルジョンを 4 日間静置させ、 CaCO_3 の結晶成長により CaCO_3 カプセルを得た。その後、0.5 mol/L disodium hydrogen phosphate aq. 10 mL 中で 35°C、4 日間静置し、 CaCO_3 のリン酸化を行い、 CO_3Ap カプセルを調製した。

【結果と考察】poly(MDO-co-HEA) は昇温にともない、下限臨界溶液温度 (LCST) 型の温度応答挙動を示し、LCST 以上でコアセルベート液滴の形成が観察された。時間経過に伴い液滴同士は互いに融着したが CaCO_3 を付着させると、液滴同士は互いに融着することなく、安定に存在した。これは、コアセルベート液滴表面の CaCO_3 が物理的な障壁となり、液滴同士の融着を防いだためと考えられた。Rhodamine B 存在下で蛍光観察すると、ピッカリングエマルジョン内に蛍光が観察されたため、疎水性低分子の内包が可能であった。さらに、ピッカリングエマルジョンに付着した CaCO_3 を結晶成長させると、付着した CaCO_3 周辺に新たな CaCO_3 が結晶成長し、 CaCO_3 カプセルが作製できた。また、poly(MDO-co-HEA) を蛍光ラベル化しカプセルを作製した結果、内部に球状に蛍光が確認できたため、poly(MDO-co-HEA) がコアとして存在し、薬物担持が期待できる。最後に、 CaCO_3 カプセルをリン酸化し、 CO_3Ap カプセルを作製した。作製した CO_3Ap カプセルの XRD 測定を行うと、 CO_3Ap 由来のピークが確認できた。以上より、本研究により調製した有機-無機ハイブリッド CO_3Ap カプセルは、薬物担持可能な骨再生足場の新規材料としての応用が期待できる。

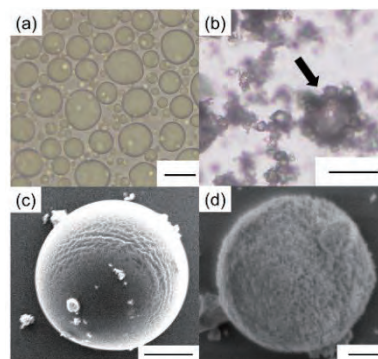


Figure 1. Microscopic image. (a) Coacervate droplets. (b) Pickering emulsion. (c) CaCO_3 capsules. (d) CO_3Ap capsules.

Preparation of biodegradable coacervate- CO_3Ap composite capsules for bone regenerative scaffold
 Syuuhei KOMATSU¹, Yui IKEDO¹, Hokuto SANTA¹, Taka-Aki ASOH², Ryo ISHIHARA¹, Akihiko KIKUCHI¹

1. Dept. Mater. Sci. & Technol. Tokyo Univ. Sci., Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan.

2. Dept. Appl. Chem., Osaka Univ., Osaka, Japan

Tel: +81-3-5876-1415, FAX: +81-3-5876-1639, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

骨セメントの流出を防止する骨腫瘍治療用形状記憶バルーンの開発

¹ 東京理科大学基礎工, ² 物材機構 (NIMS) 国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点 (MANA),
³ 筑波大院数理物質科学
 ○大内 創介^{1,2}, 新山 瑛理^{2,3}, 菊池 明彦¹, 荏原充宏^{1,2,3}

【緒言】

体の骨格を支える骨組織に腫瘍ができた場合、腫瘍摘出後の構造的補強が必要となる。例えば、骨セメント注入法が近年注目されているが、患部外への骨セメントの流出が合併症などを誘発してしまう^[1]。そこで本研究では、骨セメントを効率的に骨空洞に注入でき、かつ骨セメントの患部外への流出を抑制する形状記憶バルーンの開発を目的にした。このバルーンは poly(ϵ -caprolactone) (PCL) を架橋したフィルムをもとに作製し、骨セメントの固定安定性を高める (Figure 1)。さらに治療効果を高めるために、PCL 架橋フィルム内に磁性ナノ粒子 (MNPs) と抗がん剤 (doxorubicin: DOX) を内包することで、交流磁場 (AMF) に応答した MNPs の自己発熱と抗がん剤の放出による温熱化学治療が可能となる^[2]。以上より、骨セメントの流出を防止しかつ温熱化学治療を行う形状記憶バルーンの開発を検討した。

【実験】

形状記憶バルーンを作製するため、まず ϵ -caprolactone (CL) の開環重合後、両末端にビニル基を導入することで PCL macromonomer を合成した^[3]。これを benzoyl peroxide を開始剤に用いたラジカル重合により PCL 架橋フィルムを作製した。PCL 架橋フィルムをブロー成形により加工することでバルーンを作製した。フィルムの形状記憶特性に加えて、融点や弾性率などの物性評価を行った。さらに MNPs の AMF 印加に伴う発熱挙動と内包した DOX の PBS 中での放出挙動を測定した。

【結果と考察】

¹H-NMR 解析より、合成した PCL macromonomer の分子構造を同定した。PCL macromonomer のビニル基導入率は 91.4 % であった。示差走査熱量分析により、フィルムの融点 (T_m) を測定し、 T_m 40 °C であった。調製した PCL 架橋フィルムの形状記憶特性について引張試験機を用いて、 T_m 以上の状態で歪が 100 % となるまで伸長変形した後、再度 T_m 以上に加熱したところ、形状回復率は 97.4 % であった。このフィルムを T_m 以上へ昇温させブロー成形することでバルーンを作製することに成功した (Figure 2)。MNPs 含有フィルムに対する AMF 印加時のフィルムの発熱挙動を、赤外線サーモカメラにより測定したところ、31.6 wt% の MNPs を内包したフィルムの最大到達温度は、AMF を印加後 360 秒で 47.8 °C に達した。また、PBS 中での薬物放出試験では、内包薬物の長期的な除放が確認された。以上のことより、PCL 架橋フィルムから作製したバルーンは融点以上に加熱することで自在に形状を変形可能で、MNPs の発熱と薬物放出が可能であることが明らかとなった。本研究で作製したバルーンは、注入した骨セメントの流出を防止しかつ温熱化学療法を行うことで効果的な治療効果が期待できる。

【参考文献】 [1] T. Kobayashi, *et al.*, *Ann. Oncol.*, **2009**, 20, 1943-1947, [2] Y. J. Kim, *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, **2013**, 23, 5753-5761, [3] M. Ebara, *et al.*, *Adv. Mater.*, **2012**, 24, 273-278



Figure 1. Schematic illustration of PCL balloon system for bone tumor treatment.

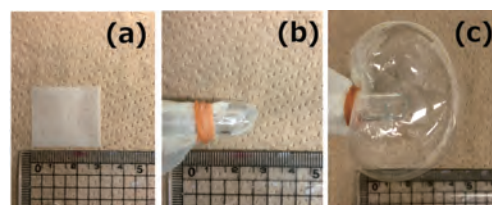


Figure 2. (a) Original PCL film. (b) Before and (c) after shape changing by air pressure.

Development of Shape-memory Balloon for Bone Tumor Treatment

Sosuke OUCHI^{1,2}, Eri NIIYAMA^{2,3}, Akihiko KIKUCHI¹ and Mitsuhiro EBARA^{1,2,3}

¹Dept. Materials Science and Technology, Tokyo University of Science, ²International Center for Materials Nanoarchitectonics (WPI-MANA), National Institute for Materials Science (NIMS),

³Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

²Tel: +81-29-860-4610, Fax: +81-29-860-4708, E-mail: EBARA.Mitsuhiro@nims.go.jp

1D-07

選択的レーザー溶融法により作製した Co-Cr-Mo 合金の耐食性と熱処理による影響

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, ²東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ³東北大学大学院工学研究科, ⁴東京医科歯科大学歯学部附属病院

○大石達也¹, 堤 祐介², 加嶋祐佳^{1,3}, 高市敦士⁴, 陳 鵬², 蘆田茉希², 土居 壽², 埜 隆夫²

【緒言】金属材料の積層造形技術は、三次元モデルから直接成形が可能であり、従来の加工法では不可能な複雑形状にも対応できることから、テーラーメイド医療への応用が期待されている。しかし、積層造形により作製した金属材料は特有の金属組織を形成するため、様々な性質が通常のプロセスにより作製したものと大きく異なる場合があることが知られている。当研究グループでは選択的レーザー溶融法 (Selective Laser Melting; SLM) により作製した Co-Cr-Mo (CCM) 合金の特有な金属組織と機械的性質との相関を報告してきた。SLM 材は特定方向に優先配向した集合組織を持ち、異方性を示す。また、この造形材に対し熱処理を施すことで等方性化するとともに機械的性質が向上することを明らかにした。一方、SLM とその後の熱処理による金属組織の変化が耐食性に及ぼす影響は未だ明らかとなっていない。そこで本大会では SLM およびその後の熱処理が及ぼす耐食性への影響を検討した。

【実験】試料には CCM 合金の SLM 材および歯科鑄造材を用いた。CCM 合金の組成について表 1 に示す。SLM 造形まま材、造形後に熱処理として 750 °C 6 h、1150 °C 1 h、1150 °C 6 h の条件で行った熱処理料の計 4 種類の試料 (22 mm × 10 mm × 10 mm、長尺方向に積層) を準備した。各試料の造形方向に垂直な面 (Z 面) と走査方向に垂直な面 (X 面) が試験面となるように、ファインカッターを用いて切断し、断面を SiC 耐水研磨紙を用いて #150~800 まで湿式研磨した。耐食性の評価として動電位アノード分極測定と自然電位測定を行った。動電位アノード分極測定では、あらかじめ試料の不働態皮膜の安定化のため 24 h 超純水に室温で浸漬した。37 °C に加温した生理食塩水 (0.9mass% NaCl 水溶液) に試料を浸漬し、10 min 後の自然電位基準で 0.1 V 卑となる電位より、掃引速度 1 mVs⁻¹ にて、電流密度が 1 mAcm⁻² に到達するまで試験を行い、分極曲線を得た。

自然電位測定では、研磨後ただちに試験溶液に浸漬し、開回路条件にて 24 h の測定を行った。

表 1 SLM 造形に用いた Co-Cr-Mo 合金の粉末組成 mass%

Co	Cr	Mo	Si	Mn	Fe	C	Ni
60-65	26-30	5~7	<1.0	<1.0	<0.75	<0.16	<0.1

【結果と考察】SLM 材の分極曲線は歯科鑄造材とほぼ同一であった。いずれの試料も明確な不働態域を示し、局部腐食を生じず、約 0.7 V_{SCE} 以上の高電位域では過不働態の挙動を示した。この結果より、SLM 材は CCM 合金の本来の優れた耐食性を維持しており、 γ 相や ϵ 相といった相構成の比率や特定方向に結晶が配向した集合組織の違いは、耐食性にほとんど影響しないことがわかった。一方、自然電位については、SLM 材が歯科鑄造材よりもやや高い電位を示す傾向がみられた。浸漬初期から 24 h までの自然電位の変化は、試料表面の不働態皮膜の形成と成長の過程を反映することから、これらの違いは歯科鑄造材の表面に露出した鑄造欠陥の影響であると考えられる。

Effect of heat treatment on corrosion resistance of Co-Cr-Mo alloy fabricated by selective laser melting process

Tatsuya OISHI¹, Yusuke TSUTSUMI², Yuka KAJIMA^{1,3}, Atsushi TAKAICHI⁴, Peng CHEN², Maki ASHIDA², 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, ³Graduate School of Engineering, Tohoku University, ⁴Dental Hospital, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-3-5280-8011, Email: ma170021@tmd.ac.jp

高分子コート材による細菌忌避活性と細胞付着促進能を併せ持つチタン合金の開発

¹九州大学 化学工学三浦研究室, ²北陸先端科学技術大学院大学 ナノマテリアルテクノロジーセンター, ³東京医科歯科大学 硬組織薬理学分野, ⁴東京医科歯科大学 口腔基礎工学
○崔 シン楠¹, 村上 達也², 田村 幸彦³, 青木 和広⁴, 星野 友¹, 三浦 佳子¹

【緒言】

チタン(Ti) およびその合金は、機械的強度、疲労、および耐食性が良好であるため、整形外科および歯科インプラントの製造に広く使用されている。インプラント治療における重大な問題として、材料由来の細菌感染があり、これは患者の罹患率および死亡率の増加に直結している。さらに、インプラントの成功率の増加のためには、材料は骨組織と一体化する必要があるが、したがって骨芽細胞と適合性があることが望まれる。上記の二つの要求のため、我々は単純なインプラント材料に対する効果的なコーティング方法を開発した。細菌や骨芽細胞の応答の違いを利用して、材料表面を修飾した細胞適合のためのインプラント表面を創製した。

【実験】

抗菌機能をもつポリエチレングリコール (PEG) および表面トポグラフィを変えずに細胞接着を促進するリン酸基から成るポリマーPEGMA500-Phosmer を重合し、TiAl₆V₄合金上に固定化した。ポリマーによる表面修飾は、X線光電子分光法 (XPS) によって確認した。Fluorescein 標識ポリマーを表面に固定することにより、表面被覆率を測定した。*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, および *Streptococcus mutans* を用いた基盤への吸着実験により、ポリマー修飾 Ti 合金の抗細菌特性を評価した。骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、ポリマー固定した Ti 合金表面上への接着数を測定した。さらにカルシウム沈着および Fibronectin (Fn) 吸着実験より、ポリマー修飾における抗細菌特性および骨芽細胞適合性の発現機構を検討した。

【結果と考察】

PEGMA500-Phosmer ポリマー固定化は XPS によって確認した。リン酸基をもたない homoPEGMA の固定化はほとんど観察されず、高活性結合部位を提供するリン酸基の重要性が示された。負電荷をもつリン酸基および PEG 側鎖を同時にもつため、PEGMA500-Phosmer 修飾 Ti 表面への *E.coli*, *S.epidermidis*, および *S.mutans* の付着は、未修飾 Ti 表面のそれらに比べ~1%まで減少した。重要なことに、PEGMA500-Phosmer 修飾は Ti 合金に対して MC3T3-E1 細胞への良好な適合性を与えた (Figure 1)。適切な長さの PEG 側鎖と負電荷をもつリン酸基をもつ PEGMA500-Phosmer は、培地中において多くの Ca²⁺さらに Fn を吸着、未処理の Ti 合金より多くの細胞接着量を達成した。以上の結果は、細菌阻害能および骨芽細胞への適合性を同時に強化する、インプラント材料のための有効なコーティング技術を提示した。この材料は、歯科および整形外科移植における潜在的な適用可能性を提供する。

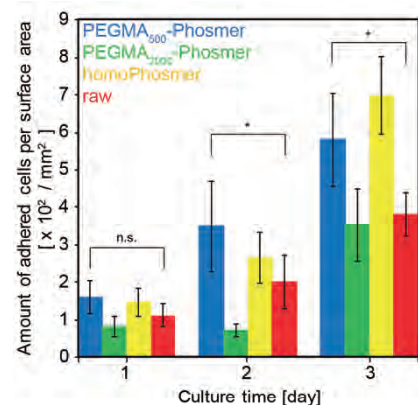


Figure 1. The amount of adhered cells on PEGMA₅₀₀-Phosmer, PEGMA₂₀₀₀-Phosmer, homoPhosmer coated and raw Ti alloy surfaces after incubation for 1, 2 and 3 d with MC3T3-E1 cell (2×10^4 cells/mL, 0.5 mL) suspensions.

Bacterial Inhibition and Osteoblasts Adhesion on Ti Alloy Surfaces Modified by Poly(PEGMA-r-Phosmer) Coating

Xinnan Cui¹, Tatsuya Murakami², Yukihiro Tamura³, Kazuhiro Aoki⁴, Yu Hoshino¹, Yoshiko Miura¹

¹Department of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Kyushu University

²Center for Nano Materials and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology

³Pharmacology, Department of Bio-Matrix, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

⁴Department of Basic Oral Health Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

Tel: +81-92-802-2769, Fax: +81-92-802-2769, E-mail: miuray@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

表面改質 MDF チタンの骨適合性

¹鶴見大学歯学部有床義歯補綴学講座, ²鶴見大学歯学部歯科理工学講座, ³東京歯科大学口腔科学研究センター, ⁴神奈川歯科大学大学院歯学研究科補綴・インプラント学, ⁵豊橋技術科学大学機械工学系 ○鈴木 銀河¹, 廣田 正嗣², 吉成 正雄³, 星 憲幸⁴, 木本 克彦⁴, 三浦 博己⁵, 早川 徹², 大久保 力廣¹

【緒言】チタンはインプラント材料として広く使用されているが、弾性係数が骨より高く、応力集中を起こすことが指摘されている。多軸鍛造 (MDF) 法は巨大ひずみ加工法の 1 つであり、結晶組織の超微細化により純金属の組成を変化させることなく、強度を向上させることが可能である。純チタンに対して MDF 法を適応したところ、引張強さやビッカース硬さが向上し、弾性係数は低下することが見い出され、インプラント材料としての応用の可能性が示唆されている。本研究では、この MDF 純チタンに表面処理を施すことにより、骨適合性の改善を試みた。

【実験】表面処理状態の確認実験には、直径 15 mm、厚さ 1 mm の MDF 純チタンディスク (MDF チタン, 川本重工) を用いた。耐水研磨紙 (#1200 まで) を用いて研磨した後、純水中およびエタノール中で超音波洗浄し、デシケータ内で 1 日間保存した。これらの試料に濃硫酸による酸処理を行い、接触角の測定および SEM による表面状態の観察を行った。

動物埋入実験には直径 1 mm、長さ 3 mm の MDF チタンインプラント (川本重工) を用いた。対照として無処理 MDF チタンインプラントを用いた。インプラント体には同様に濃硫酸による酸処理を施した。6 週齢 Wistar 系ラットの第一大臼歯を全身麻酔下にて抜歯し、抜歯窩にインプラント体を埋入した。埋入 6 週後に、試料を周囲組織とともに取り出した。常温重合レジンにより包埋後、非脱灰研磨標本を製作し、メチレンブルー・塩基性フクシンによる重染色を行い、病理組織学的に骨適合性を評価した。

【結果と考察】酸処理を行った MDF チタン表面を SEM にて観察した。図 1 に示すように、フラクタル構造を有する緻密で均一な粗造凹凸面が観察できた。接触角の結果から、表面処理により MDF チタンディスク表面が超親水性に変化していることが分かった。

図 2 に MDF チタンインプラント埋入後の骨形成状態の病理組織像を示す。酸処理 MDF インプラントの方が良好な骨形成が確認できた。骨-インプラント接触率 (BIC) を測定した結果、酸処理 MDF チタンインプラントで BIC は約 85% であり、無処理 MDF チタンインプラントよりも有意に高い値であった。

以上、酸処理による表面改質で MDF チタンインプラントの骨形成能を改善できることが示唆された。

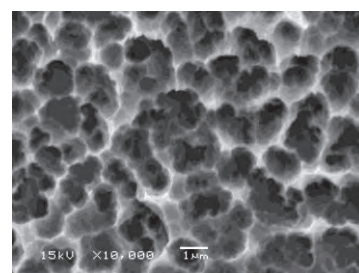


図 1 硫酸処理後の MDF チタン表面の SEM 像

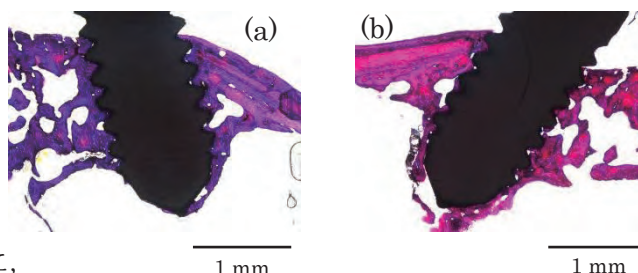


図 2 MDF チタンインプラントの病理組織像
a) 無処理 MDF インプラント,
b) 酸処理 MDF インプラント

Improvement of bone formation ability of MDF Titanium by surface treatment Ginga Suzuki¹, Masatsugu Hirota², Masao Yoshinari³, Noriyuki Hoshi⁴, Katsuhiko Kimoto⁴, Hiromi Miura⁵, Tohru Hayakawa², Chikahiro Ohkubo¹, ¹Department of Removable Prosthodontics, Tsurumi University School of Dental Medicine, ²Department of Dental Engineering, Tsurumi University School of Dental Medicine, ³Tokyo Dental College Oral Health Science Center, ⁴Prosthodontics & Oral Implantology, Graduate School, Kanagawa Dental University, ⁵Department of Mechanical Engineering, Toyohashi University of Technology
Tel: +81-45-580-8420, Fax: +81-45-573-9599, E-mail: 2711007@stu.tsurumi-u.ac.jp

高次構造制御による抗菌性チタニアナノシートの最適化

¹東京医科歯科大学学生体材料工学研究所, ²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, ³大連理工大学, ⁴大阪大学接合科学研究所

○野崎 浩佑¹, 林 建一郎², 譚 振権³, 堀内 尚紘¹, 山下 仁大¹, 三浦 宏之², 大原 智⁴, 位高 啓史¹

【緒言】チタニア (TiO₂) は光触媒作用によるセルフクリーニング効果を発揮することから, 生活環境の中で様々な分野で利用されている. 歯科領域においては, 義歯の洗浄や歯の漂白などで既に応用されている. チタニアのセルフクリーニング効果は, UV 照射による活性酸素 (ROS) の生成によるものと考えられており, その作用を利用して, 抗菌性生体材料への利用が検討されている.

また, 光触媒作用の高機能化のため, (001) 面を多く露出したチタニアが着目されている. すでに Yang らはフッ化水素を用いて (101) 面の結晶成長を抑制し, (001) 面を多く露出した面の合成に成功している. しかしながら, フッ化水素の使用には様々な制約が存在し, 生体材料として用いた際にその残留物の危険性が存在する.

そこで本研究では, 結晶成長の抑制材としてフッ化水素を用いずに (001) 面を露出したチタニアナノシートを作製し, その光触媒作用と抗菌活性を評価した.

【実験】ヘキサフルオロチタン酸アンモニウムとチタンブトキシドを出発原料とし, 180°C, 6 時間水熱合成を行った. 本研究では, チタニアナノシートの大きさの制御のため, フッ素とチタンの仕込みモル比を, 1.0 (NS1.0), 1.2 (NS1.2), 1.5 (NS1.5), 1.8 (NS1.8), 2.0 (NS2.0) とした. 水熱合成後, 得られた試料を蒸留水およびメタノールを用いて洗浄し, 蒸留水中にて保管した. 試料のキャラクタリゼーションとして, X 線回折法 (XRD), X 線光電子分光法 (XPS), 誘導結合プラズマ発光分析 (ICP-AES), 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った.

作製したチタニアの ROS 活性を検討する為に, ハイドロキシルラジカルの評価を行った. 試料を 20mM テレフタル酸二ナトリウム (DTA) と混合し, 波長 365nm, 2.5mW/cm² にて 2 時間 UV 照射を行った. DTA は波長 312nm の入射により 425nm の波長を放出する 2-ハイドロキシテレフタル酸に変換されるため, UV 照射後の蛍光発光強度を求めた.

抗菌活性の評価には大腸菌 (NBRC3972) を用いて行った. 前培養を行い, 濁度計を用いて濃度調整を行った菌液に作製したチタニアナノシートを混和し, 波長 365nm, 2.5mW/cm² にて 2 時間 UV 照射を行った. UV 照射後, ATP 法 (BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, Promega) により生細菌数を測定した.

【結果と考察】作製した試料は, いずれもアナターゼ型酸化チタンであった. また, XPS 測定より, チタン, 酸素, 炭素のピークは認められたが, フッ素に由来するピークは認められなかった. TEM 観察より各試料の大きさを測定したところ, F/Ti 比の増加に伴い, ナノシートの大きさが増加した. また, (001) 面の割合を過去の報告を参考に求めたところ, 62.6 (NS1.0), 60.3 (NS1.2), 74.9 (NS1.5), 89.2 (NS1.8), 92.9% (NS2.0) であった.

UV 照射により, それぞれの試料においてハイドロキシルラジカルが生成し, NS1.2 が優れた ROS 活性を有していた. また, 各試料を用いて抗菌活性を評価したところ, 濃度依存的に細菌数が減少した. また, NS1.0 が他の試料と比較して優れた抗菌活性を有していた. 以上より, 粒子径の小さいチタニアナノシートが優れた抗菌性生体材料として利用できる可能性が示唆された.

Optimization of antibacterial titanium dioxide nanoparticle with superstructure

Kosuke Nozaki¹, Kenichiro Hayashi², Zhenquan Tan³, Naohiro Horiuchi¹, Kimihiro Yamashita¹, Hiroyuki Miura², Satoshi Ohara⁴, Keiji Itaka¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ³Dalian University of Technology, ⁴Joining and Welding Research Institute, Osaka University

Tel: +81-3-5280-8087, Fax: +81-3-5280-8088, E-mail: k.nozaki.fpro@tmd.ac.jp

水酸アパタイト被覆 Mg 合金のラット大腿骨埋入による腐食・骨形成挙動の評価

¹物質・材料研究機構 構造材料研究拠点, ²鹿児島大学 歯学部, ³産業技術総合研究所 製造技術研究部門

○廣本 祥子¹, 野添 悦郎², 花田 幸太郎³, 古閑 崇², 吉村 卓也², 嶋 香織², 岐部 俊郎², 久米 健一², 中村 典史²

【緒言】

生体吸収性/生体内溶解性 Mg 合金は骨固定材やステントなどへの適用が期待され, Mg 合金の生体内での溶解速度制御および生体適合性向上のために様々な表面被覆が検討されている. 本研究グループでは, 骨固定材用 Mg 合金のための水酸アパタイト (HAp) およびリン酸八カルシウム (OCP) 被膜を開発し, 培養液中およびマウス皮下での被覆による Mg 合金の腐食溶解の抑制と, 細胞接着性の向上を明らかにした¹⁾. また, 骨芽細胞培養試験より, HAp 被覆によりアルカリフォスファターゼ活性が向上することを明らかにした²⁾. 本研究では, HAp 被覆した Mg 合金をラット大腿骨に埋入し, HAp 被膜が Mg 合金の腐食挙動および新生骨形成に及ぼす影響を検討した.

【実験】

Mg-Ca 合金および Mg-4mass% Y-3mass% RE (WE43) 合金ロッド (直径 1.5 mm, 長さ 3 mm) の表面を電解研磨し, 未被覆材とした. HAp 被覆処理溶液 (Ca-EDTA-KH₂PO₄-NaOH) を 90°C に加温し, 1 h 浸漬し, HAp 被覆を行った. 未被覆材および HAp 被覆材をラット (Wister 系メス, 15~19 週齢) の大腿骨に埋入した. 摘出までに鎮静下での経時的な単純 X 線像による観察を行うとともに, 埋入後 6 か月までの 4~5 時期に安楽死後, 大腿骨とともに Mg 合金を摘出し, マイクロ CT による観察を行った. 摘出試料より断面観察用試料を作製し, 電子顕微鏡 (SEM) 観察および組成分析を行った.

【結果と考察】

埋入 10 日目の未被覆および HAp 被覆 Mg-Ca 合金の骨髄と接していた箇所の断面 SEM 像を図 1 に示す. 未被覆材表面は, ほぼ全面が ~100 μm の Mg(OH)₂ を主成分とする腐食生成物層に覆われていた. HAp 被覆材表面にも HAp 被膜の下側に局所的に <50 μm の Mg(OH)₂ 層の形成がみられたが, 未被覆材よりも腐食が抑制されたことは明らかであった. 骨髄に接していた表面では, 未被覆材表面には新生骨はみられなかった. HAp 被覆材表面には新生骨の形成がみられ, 新生骨は HAp 被膜と密接に接合していた. HAp 被膜表面に新生骨が形成されている箇所と被膜下で腐食が発生している箇所には相関はみられないようであった. HAp 被覆は, 生体内で腐食溶解を抑制し, 新生骨の形成を促進することが明らかになった.

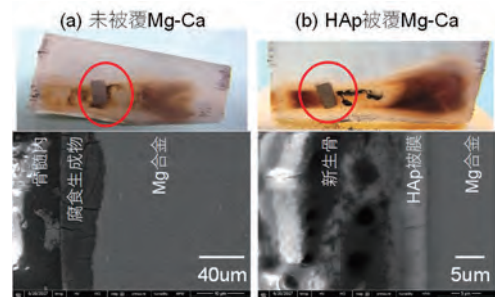


図 1 ラット大腿骨埋入 10 日後の (a) 未被覆および (b) HAp 被覆 Mg-Ca 合金の骨髄と接していた表面の断面 SEM 像.

1) S. Hiromoto, M. Inoue, T. Taguchi, M. Yamane, N. Ohtsu, *Acta Biomater.*, 11, 520 (2015).

2) 廣本祥子, 野田なほみ, 山崎智彦, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 (2017).

Corrosion behavior and Effect on Bone Formation of Hydroxyapatite-coated Mg alloy in Rat Femur
Sachiko Hiromoto¹, Etsuro Nozoe², Kotaro Hanada³, Takashi Koga², Takuya Yoshimura², Kaori Shima², Toshiro Kibe², Kenishi Kume², Norifumi Nakamura²

¹ Research Center for Structural Materials, National Institute for Materials Science ² Faculty of Dentistry, Kagoshima University, ³ Advanced Manufacturing Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Tel: +81-29-859-2610, Fax: +81-29-859-2515, E-mail: HIROMOTO.Sachiko@nims.go.jp

HAp/Col の新規 EPD コーティングは基板金属への強力な接着を実現する

¹ 東京医科歯科大学大学院 顎顔面矯正学分野

² 物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点バイオセラミックスグループ

³ 物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点微粒子工学グループ

○岩波(門脇) 佳緒里^{1,3}, 打越 哲郎³, 上園 将慶¹, 菊池 正紀², 森山 啓司¹

【緒言】

近年、歯科矯正用アンカレッジデバイスは急速に普及したが、より安全性・有効性の高い治療を実現するため、様々な改良が試みられている。ハイドロキシアパタイト/コラーゲン骨類似ナノ複合体 (HAp/Col) ^[1] は、骨修復過程に完全に取り込まれて新生骨に置換することから、その多孔体は臨床的に骨空隙充填材として日本で実用化されている。我々は HAp/Col ディップコーティングが Ti ロッドへの迅速なオッセオインテグレーションを誘起することを発見した^[2]。これは、早期により速い歯科矯正治療を可能にするオンプラントタイプアンカーポストの有力な候補の 1 つである。一方、ディップコーティングは、コーティング厚の制御や基板金属との接着力などに難点があるため、臨床応用するためにはそれらの改善が必要である。そこで我々は、素材懸濁液ならびに析出条件を変化することで、基材上への素材のコーティング厚と形態を容易に制御できる、電気泳動体積法 (EPD) に着目して、新たな HAp/Col コーティング法の開発を進めている。本報告では、Ti 基板に EPD 法で形成させた HAp/Col コーティングを、物理的、生物学的に評価した。

【実験】

HAp/Col 粉末は通法^[1]に従って調製し、乳鉢乳棒で直径 25 μm 未満に粉碎した。HAp/Col に適合するよう既報^[3]の条件をわずかに修正し懸濁させた。具体的には 2-プロパノール (C₃H₅(OH)₃) および粒子電荷調整剤、Mg(NO₃)₂・6H₂O を添加したポリプロピレン容器に、HAp/Col 粉末、グリセリンおよび蒸留水を加え、HAp/Col 粒子を陽性にチャージさせた。この混合物を氷水中で超音波処理、ZrO₂ ボールで湿式ボールミル処理、再び氷水中で超音波処理した。陰極基材である Ti シートを洗浄し、40%硝酸と脱イオン水で 30 分間、それぞれ ASTM F86 に準拠して不動態化した。陽極対極にはステンレス鋼板を用いた。定電圧電源によって印加される電場強度および堆積時間を、最良の EPD 条件を査定するためのパラメータとした。EPD 後、基材を回収し、2-プロパノール中に浸漬洗浄、室温で 24 時間乾燥させた。EPD 処理前後の基材の重量を測定し、被覆層の質量を算出した。堆積物の無機結晶相は XRD で同定された。被覆層の形態および元素マッピングを SEM、EDS で観察した。コーティングの接着強度は、ASTM D3359 に記載されているテープ試験によって測定した。骨芽細胞様細胞 MG63 を HAp/Col コーティング Ti 上に播種し、増殖および骨形成活性を調べた。対照群には EPD 処理前の Ti および組織培養ポリスチレンディッシュを使用した。

【結果と考察】

Ti 表面の表面色は EPD の前後で変化した。すなわち、EPD により Ti 上に HAp/Col 層が形成されていると考えられる。実際、EPD によって Ti シートの質量が増加した。堆積時間および/または印加電圧が増加するにつれて、コーティング層の質量が増加した。被覆層の無機相は、XRD により HAp/Col の無機成分である低結晶性 HAp と同定した。SEM で観察した低堆積量のコーティング層は、明らかな亀裂のない基板表面の凹凸と共に HAp / Col の均一な堆積を示した。しかし、堆積量の増加に伴って亀裂が増加した。EPD コーティング層はテープ試験の後に残っていたが、浸漬コーティング層は完全に除去された。これらの結果から、EPD の堆積時間および印加電圧を変化させることによって、コーティング厚さおよび形態が精密に制御された HAp/Col コーティング層を Ti 上に形成できることが明らかとなった。細胞培養試験の結果については当日報告する。

[1] M. Kikuchi, et al., *Biomaterials* 2001; 22: 1705. [2] M. Uezono, et al., *J Biomed Mater Res B* 2013; 101B: 1031. [3] C. Zhang, et al., *ECS J Solid State Sci Tech* 2014; 3: R195.

Novel EPD Coating of HAp/Col Realizes Strong Adhesion to Substrate Metal

Kaori Iwanami-Kadowaki^{1,2}, Tetsuo Uchikoshi², Masayoshi Uezono¹, Masanori Kikuchi², Keiji Moriyama¹

¹Department of Maxillofacial Orthognathics, Graduate School of Tokyo Medical and Dental University

²Research Center for Functional Materials, National Institute for Material Science

Tel: +81-29-860-4503, Fax: +81-29-860-4724, E-mail: KIKUCHI.Masarori@nims.go.jp

過飽和液中レーザー照射法による象牙質表面へのフッ素担持アパタイトの迅速成膜

¹産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門,²北海道大学大学院 歯学研究院

○大矢根 綾子¹, 坂巻 育子¹, 中村 真紀¹, 古賀 健司¹, 薮 佳奈子², 眞弓 佳代子², 宮治 裕史²

【緒言】アパタイトは優れた生体親和性と骨伝導性を示すことが知られている。一方、フッ素は歯質強化および抗菌作用を持つことが知られている。歯周治療後の歯面にフッ素担持アパタイトを迅速成膜できれば、根面う蝕の予防ならびに歯周病の再発防止に有効と期待される。近年発表者らは、歯質のモデル物質として焼結水酸アパタイト (sHA) 基材を用い、フッ素を添加したリン酸カルシウム過飽和液中で 30 分間パルスレーザー照射を行うことで (過飽和液中レーザー照射法 [1])、同基材表面にフッ素担持アパタイトを成膜できることを報告した [2]。得られたフッ素担持アパタイト膜は、sHA 基材の酸溶解を抑制したほか、う蝕原因菌 (*S. mutans*) に対し抗菌性を示した [2]。本研究では、過飽和液中レーザー照射による sHA 基材の表面構造変化を経時的に調べるとともに、本成膜法を抜去歯由来のヒト象牙質に適用することで、歯の表面改質における有効性を予備的に検討した。

【実験】基材として、sHA (10 mm × 10 mm × 2 mm, Hoya Technosurgical製) ならびにヒト象牙質 (5~6 mm × 2 mm × 1 mm) を用いた。象牙質基材は、患者の同意を得て提供された抜去済み歯牙より切り出し、表面を耐水研磨紙 #600 で研磨後、超音波洗浄および 10% EDTA 処理を施して作製した。フッ化ナトリウム (1 mM) を添加したリン酸カルシウム過飽和溶液 (25°C) 中に基材を設置した。同基材の表面に、Nd:YAG ナノ秒パルスレーザー (30 Hz, Quanta-Ray LAB-150-30, Spectra-Physics製) の非集光ビーム (355 nm, 6 W/cm²) を 5~30 分間照射した。レーザー光照射面の組成および構造の変化を X 線回折分析、及び走査電子顕微鏡分析により調べた。また、基材表層の断面組織については透過電子顕微鏡 (TEM) 分析により調べた。断面 TEM 試料は集束イオンビーム加工観察装置を用いたマイクロサンプリング法により作製した。なお、ヒト象牙質を用いた実験は、産業技術総合研究所および北海道大学の倫理委員会の承認を受けて実施された。

【結果と考察】まず、sHA 基材に対するレーザー光照射時間を変化させ、基材の表面構造変化を調べた。分析の結果、照射 5 分後には基材表面に対し垂直方向に伸長した針状ナノ結晶が析出し、照射 30 分後にはそれらが成長して基材表面に高密度に集積することで、緻密なフッ素担持アパタイト膜を形成することが分かった。次に、ヒト象牙質基材に対し 30 分間、過飽和液中レーザー照射を行った。基材の断面 TEM 分析の結果、sHA 基材の場合と同様に、象牙質基材表面に対し垂直方向に伸長したフッ素担持アパタイトナノ結晶よりなる表面膜の生成が確認された (右図)。

以上、本過飽和液中レーザー照射法によれば、sHA 基材だけでなく、抜去歯由来のヒト象牙質基材の表面にも、フッ素担持アパタイトの迅速成膜が可能であることが明らかとなった。

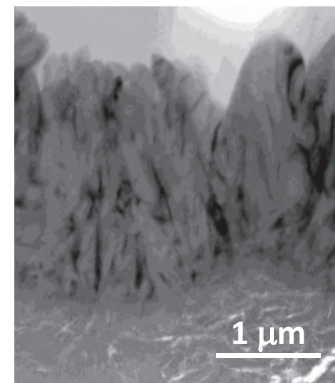


図 象牙質基材の断面 TEM 像

[1] Oyane et al, J Biomed Mater Res A, 100A, 2573, 2012. Nakamura et al, J Mater Chem B, 4, 6289, 2016.

[2] 大矢根他, 第39回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 80, 2017.

【謝辞】本研究はJSPS科研費 (JP17H02093, JP15F15331) および天田財団の助成を受けて実施された。TEM分析では産総研TIA推進センターの齋藤徳之氏および吉澤徳子博士にご協力頂いた。

Rapid coating of fluoride-incorporated apatite on dentin by laser irradiation in supersaturated solution

Ayako Oyane¹, Ikuko Sakamaki¹, Maki Nakamura¹, Kenji Koga¹, Kanako Shitomi², Kayoko Mayumi Hirofumi Miyaji²

¹ Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

² Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University

Tel: +81-29-861-4693, Fax: +81-29-861-3005, E-mail: a-oyane@aist.go.jp

調製方法の異なる OCP/Gel 複合体のラット頭蓋冠での骨形成の評価

¹ 東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, ² 九州大学 先導物質化学研究所

³ 東北大学大学院歯学研究科歯学イノベーションリエゾンセンター

○酒井 進¹, 穴田 貴久², 塩飽 由香利^{1,3}, 濱井 瞭¹, 土屋 香織¹, 鈴木 治¹

【緒言】リン酸オクタカルシウム(OCP)は水溶液中からハイドロキシアパタイト (HA) 形成に先だって析出し, 生体内では骨アパタイト結晶の前駆体とされる物質である¹⁾. その合成物は骨欠損への埋入によって HA 相へ転換し, *in vitro* では骨芽細胞分化を促進することから, 高い骨伝導を示す材料である^{1,2)}. これまで, 単一相としては焼結できない OCP の操作性を向上させるため様々な高分子材料との複合体を作製してきた³⁾. OCP とゼラチンとの複合体(OCP/Gel 複合体)は, 高い生体吸収性と骨伝導を示す材料のひとつである⁴⁾. OCP/Gel の調製方法として共沈法と混合法を報告したが, これらの調製で得られる OCP 結晶の性状は異なり生体内の活性に違いがある⁵⁻¹⁰⁾. しかしながら, 調製方法の異なる OCP/Gel 複合体の同一骨欠損条件における骨形成能については明らかになっていない. そこで, 本研究では様々な用量の OCP とゼラチンとの複合体を作製し, 骨再生能の違いをラット頭蓋冠にて比較検討した.

【実験】共沈法または混合法を用いて得られた OCP を回収し, 様々な混和比の OCP とゼラチンから成る OCP/Gel 複合体を作製した. これら複合体は, 直径 9 mm, 厚さ 1 mm のディスク状に成形した. ディスクを減圧加熱滅菌し, 直径 9 mm のラット頭蓋冠臨界径骨欠損に埋入した. 8 週間後に試料を含むラット頭蓋冠を摘出した. 臨界径骨欠損のみで試料を何も入れない頭蓋冠をコントロールとした. 摘出したラット頭蓋冠の試料埋入部は, 軟 X 線, マイクロ CT 撮影し, X 線学的評価を行った. また, 脱灰標本は, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて組織学的評価を行った. 試料埋入部の骨形成の評価には, 画像処理ソフトを用いた. すなわち, マイクロ CT 撮影像では既存骨部位の CT 値に基づいて OSIRIX で新生骨の体積を算出するとともに, 軟 X 線撮影像における X 線不透過部位の面積および, 組織標本における試料埋入部の骨組織の面積は Photoshop, ImageJ で算出し, それぞれを骨形成の評価とした.

【結果と考察】共沈法で合成した OCP を用いて高用量の OCP/Gel 複合体試料を作製する事ができ, 混合法と同条件で比較できた. コントロールと比較し, それぞれの OCP/Gel 複合体は優れた骨形成能を示した. また, 軟 X 線, マイクロ CT および HE 染色での評価により新生骨量の割合は異なることがわかった. 一方, OCP の混和比に関連して新生骨量が変化する傾向を示したが最適な混和比が存在することが示唆された. 今後は骨形成の違いのメカニズム解明や臨床応用上の課題に向け, OCP および複合体の試料の作製方法や埋入期間など様々な条件で骨形成能を評価する必要があると考える.

【参考文献】

- 1) Suzuki O et al. *Biomaterials* 27 (2006) 2671.
- 2) Anada et al. *Tissue Eng Part A* 2008;14:965-978.
- 3) Suzuki O. *Japanese Dent Sci Rev* 49 (2013) 58.
- 4) Handa T et al. *Acta Biomater* 8 (2012) 1190.
- 5) Honda Y et al. *Tissue Eng Part A* 15 (2009) 1965.
- 6) Miyatake N et al. *Biomaterials* 30 (2009) 1005.
- 7) Suzuki O. *Acta Biomater* 6 (2010) 3379.
- 8) Ishiko-Uzuka R et al. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 105 (2017) 1029.
- 9) Saito K et al. *RSC Advances* 6 (2016) 64165.
- 10) Chiba S et al. *J Biomed Mater Res A* 104 (2016) 2833.

Quantitative analysis of bone regeneration of two kinds of OCP/gelatin composites implanted into rat calvaria bone defect

Susumu Sakai¹, Takahisa Anada², Yukari Shiwaku^{1,3}, Ryo Hamai¹, Kaori Tsuchiya¹, Osamu Suzuki¹

¹Division of Craniofacial Function Engineering Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan,

²Soft Materials Chemistry, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Fukuoka, Japan

³Liaison Center for Innovative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

Tel: +81-22-717-7635,

E-mail: sakai-s@dent.tohoku.ac.jp; suzuki-o@m.tohoku.ac.jp

Ta, Ag 含有非晶質リン酸カルシウム薄膜の作製と擬似体液中における溶解挙動

¹ 東北大学大学院工学研究科

○上田 恭介¹, Wu Jun¹, 成島 尚之¹

【緒言】 人工歯根等の硬組織代替デバイスは骨との迅速かつ強固な結合が必要である。当グループではこれまで、RF マグネトロンスパッタリング法による非晶質リン酸カルシウム(ACP)コーティングに着目し、ACP コーティング膜は生体内において溶解性を示すこと、溶解に伴い骨形成が促進されること、を明らかにしてきた[1]。加えて、Nb や Ta を添加することで ACP コーティング膜の溶解速度を抑制できることも明らかにしてきた[2]。一方、デバイス表面に付着した細菌が原因となる手術部位感染(SSI)の予防、すなわち抗菌性も求められている。Ag イオンは多くの細菌に対して抗菌性を発現し、生体に対して低毒性、耐性菌を生じにくい、といった特徴を有する。ACP に Ta と Ag を含有したコーティング膜は、ACP の溶解性を制御することによる長期間の骨形成能向上と Ag による抗菌性の両方の発現が期待できる。そこで本研究では、Ta および Ag 含有 ACP コーティング膜を RF マグネトロンスパッタリング法により作製し、その擬似体液中での溶解挙動を調査した。

【実験】 β型リン酸三カルシウム(Ca₃(PO₄)₂, β-TCP)、Ta₂O₅ および Ag₂O 混合粉末を用い、Ag 濃度は 10 mol% に固定し、Ta 濃度を 0, 0.9, 9 mol% と変化させたターゲットをホットプレス法にて作製した。組成を Table 1 に示す。鏡面研磨 CP Ti およびブラスト処理 Ti-6Al-4V (10×10×1 mm) を基板として、膜厚 0.5 μm のコーティング膜を RF マグネトロンスパッタリング法により作製した。成膜時の RF 出力を 10 ~ 50 W と変化させた。鏡面研磨基板上に作製したコーティング膜の組成を XRF、生成相を薄膜 XRD、微細構造および元素分布を STEM および XPS にてそれぞれ分析した。JIS Z 2801 の抗菌性評価に用いられる希釈ブイオン培地(NB)にブラスト処理基板上に作製したコーティング膜を 24 時間浸漬し、構成元素の溶出量を ICP-MS にて測定した。浸漬後コーティング膜は SEM/EDX にて観察した。

【結果と考察】 同じ RF 出力で比較すると、ターゲット中 Ta 濃度の増加に伴い成膜速度は増加することが分かった。RF 出力の増加に伴いコーティング膜中の Ag 濃度は減少した。これは、焼結後のターゲット中の Ag は金属状態であり、高 RF 出力側ではターゲット表面温度が上昇することで Ag が蒸発し、基板に到達する Ag 量が減少したためと考えられる。薄膜 XRD からは、いずれの条件においても生成相は非晶質相であった。加えて、いずれの構成元素も深さ方向に対して均一に分布していることが STEM 分析より明らかとなった。

Ta を含有しない Ag-TCP ターゲットを用いて作製したコーティング膜は 24 時間の希釈 NB 培地浸漬により全て溶解した。これに対し、Ta を含有した ACP コーティング膜は 24 時間後においても残存しており、Ta 濃度の増加に伴い、溶解は抑制されることが明らかとなった。いずれのコーティング膜からも Ag イオンの溶出が確認され、抗菌性の発現が期待される。

参考文献 [1] S. Yokota et al.: *Implant Dentistry*, 23 (2014) 343–350. [2] 上田恭介ら: 日本金属学会第 160 回大会(2017 年春期) 講演番号 200.

Table 1 Notation and chemical composition of targets used in this study (mol %)

Notation	Ca	P	Ag	Ta
Ag-TCP	54.0	36.0	10.0	–
(Ag+L-Ta)-TCP	53.5	35.6	10.0	0.9
(Ag+H-Ta)-TCP	48.6	32.4	10.0	9.0

Fabrication of Ag and Ta-containing Amorphous Calcium Phosphate Films and their Dissolution in Simulated Body Fluids

Kyosuke Ueda¹, Jun Wu¹, Takayuki Narushima¹

¹Department of Materials Processing, Tohoku University

Tel: +81-22-795-7295, Fax: +81-22-795-7295, E-mail: ueda@material.tohoku.ac.jp

銀または銅をドーブしたチタンのアパタイト形成能と可視光照射による抗菌性の向上

¹ 東北大学大学院医工学研究科, ² 東北大学大学院歯学研究科, ³ 東北大学金属材料研究所
 ○鈴木 香苗¹, 川下 将一¹, 岩津 実里², 目代 貴之³, 金高 弘恭²

【緒言】チタン(Ti)板に水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液および加熱処理を施すと、その表面にチタン酸ナトリウムや酸化チタン(TiO₂)を含む層が形成され、同層は擬似体液(SBF)中でアパタイトを形成する。そこで、加熱処理前に微量金属元素含有水溶液によって処理することで、Ti表面に微量の金属元素をドーブし、そのアパタイト形成能を保持しつつ抗菌性を付与する研究が国内外で広く行われている。一方、ドーブする金属元素によってはTiO₂に可視光応答形光触媒能を与え得るため、金属元素そのものによる抗菌効果だけでなく、可視光照射によってTiO₂から発生したラジカルによる抗菌効果も期待できる。そこで本研究では、銀または銅をドーブしたTi板のアパタイト形成能を評価し、可視光照射下での抗菌試験およびラジカル測定を行った。

【実験】1 cm角、厚さ1 mmのTi板を5 MのNaOH水溶液に浸漬し、60°Cで24時間振とうした後、1 mMの硝酸銀水溶液または1 mMの硝酸銅水溶液に浸漬し、80°Cで48時間振とうした。その後、各水溶液からTi板を取り出し、超純水で洗浄し、600°Cで1時間加熱処理した。これらのサンプルをそれぞれAL-Ag-HT、AL-Cu-HTとし、NaOH水溶液処理後、加熱処理を行ったサンプルをAL-HTとした。これらサンプルを36.5°CのSBFに7日間浸漬した。SBF浸漬前後のサンプルの表面構造を、走査型電子顕微鏡、薄膜X線回折装置(TF-XRD)およびX線光電子分光分析装置(XPS)を用いて分析した。また、JIS R 1752:2013を参考に可視光照射下での大腸菌に対する抗菌試験を行った。さらに、可視光を照射したサンプルからのラジカル発生を電子スピン共鳴装置(ESR)により調べ、キシレノールオレンジを用いた過酸化水素比色定量も行った。

【結果と考察】SBF浸漬前のサンプルはいずれもその表面に網目構造を形成し、SBF浸漬後にはアパタイトを形成した。従って、今回得られたサンプルはいずれもアパタイト形成能を有していることが確認された。TF-XRDおよびXPS測定によれば、ドーブした各抗菌金属元素は、AL-Ag-HTにおいてはAgおよびAg₂O、AL-Cu-HTにおいてはCuおよびCuOとして存在していた。抗菌試験の結果、可視光照射無しの場合に比べて、可視光照射有りの場合、全サンプルにおいて大腸菌の増殖が抑制された。特にAL-Ag-HTおよびAL-Cu-HTにおいては、可視光照射によって大腸菌生菌数が極めて少なくなった(Figure 1)。ESR測定によれば、可視光を照射した全サンプルからヒドロキシラジカルが検出され、AL-Cu-HTからは炭素に起因すると思われるラジカルも検出された。過酸化水素発生量測定においては、全サンプルから過酸化水素の発生が確認されたものの、サンプル間でその発生量に有意な差は見られなかった。以上より、銀や銅をドーブしたTiは、各金属元素による抗菌効果に加え、可視光照射による光触媒効果によってラジカルが発生し、より強い抗菌効果を発揮したと考えられる。また、銅をドーブしたTiにおいては、炭素に起因すると思われるラジカルが発生し、それが抗菌性に寄与した可能性がある。

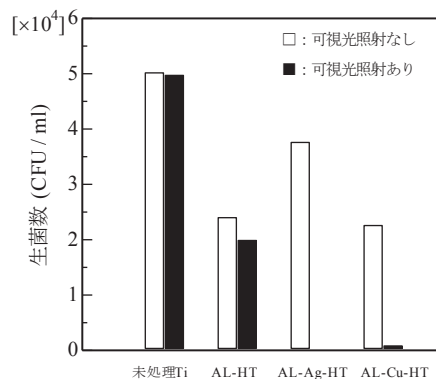


Figure 1. Visible bacteria count of *E. coli* on samples with or without irradiation of visible light.

Apatite-forming ability and visible-light enhanced antibacterial activity of titanium doped with silver or copper

Kanae Suzuki¹, Masakazu Kawashita¹, Misato Iwatsu², Takayuki Mokudai³ and Hiroyasu Kanetaka²

¹Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University, ²Graduate School of Dentistry, Tohoku University, ³Institute for Materials Research, Tohoku University

Tel: +81-022-795-3937, Fax: +81-022-795-4735, E-mail: kanae.suzuki.r1@dc.tohoku.ac.jp

亜鉛を含む層状複水酸化物への揮発性硫黄化合物の吸着とその溶解挙動

¹大阪市立大学大学院工学研究科, ²朝日大学歯学部

○横川 善之¹, 梯 広大¹, 若林 秀光¹, 尾池 和樹², 森田 侑宜², 藤井和夫², 土井豊², 川木晴美², 堀田正人²

【緒言】口腔内には 300 種以上, 数千億の菌が常在し, 歯周縁下～歯周ポケット内のプラーク細菌群は種々の細胞毒性代謝産物を産生する. システインやメチオニンなど含硫蛋白質の脱アミノ反応による代謝産物 VSC(揮発性硫黄化合物)は, 口臭の原因であるとともに歯周病憎悪因子であり, 齲蝕歯修復材の変色, 亜急性～急性感染症の一因とされる. マウスケア商品は殺菌成分と香料を含むが, 香料による臭いの減弱効果は一時的であり, 菌は死滅してもセメント質に付着し, 歯周ポケット内に残存する. 迅速な VSC 除去には, 臭気成分と親和性の高い成分を含み, ミクロ孔を持つ吸着剤が望まれる. 我々は, 層状複水酸化物の層を構成する水酸化物多面体に代謝物と親和性の高い元素を配置することにより, 硫化物を速やかに除去できることを *in vitro* 試験で明らかにし, マウスガードを用いた試験でも良好な結果を得ている. 今回, 層状複水酸化物のイオン溶出と硫黄化合物吸着に関し, 検討したので報告する.

【実験】層状複水酸化物は共沈法で合成した. 炭酸ナトリウムと硝酸アルミニウム九水和物と硝酸亜鉛六水和物を溶解, 混合し, pH が 10 前後になるように調整した. 室温で 24 時間攪拌し, ろ過, 洗浄した. さらに 80 °C で 12 時間乾燥, 解砕した. 得られた試料の硫化物の吸着は以下のように測定した. 所定の濃度に調整した硫化水素水の入った密閉容器に, 得られた試料を投入し, ヘッドスペースと水溶液をソルベントフラッシュ法にてガスタイトシリンジで採取し, FPD-GC で硫化物の濃度変化を測定した. 密閉容器の内容積は 200 ml で硫化水素水は 150 ml, 試料は 0.1 g であり, 密閉容器内の硫化物濃度は 0.8 mg/L である. 硫化水素水に浸漬前後の試料の粉末 X 線回折図形, フーリエ変換赤外分光スペクトル, SEM 像および EDS スペクトルを取得し, 構造の変化について分析した. また Zn 溶出量を XO 指示薬によるキレート滴定により測定した. Al のマスキングにフッ化アンモニウムを用いた.

【結果と考察】共沈法で合成した試料は, 0.2～0.3 μm の粒子であり, X 線回折法により, 亜鉛を含む層状複水酸化物であることを確認した. 硫化水素水に投入すると, 直ちに硫化水素水中の硫化物の濃度は低下した. 2～3 時間後には, 密閉容器のヘッドスペースと硫化水素水の硫化物濃度は, FPD-GC の検出限界となった. 1 回分の歯磨剤に含まれる研磨剤相当の量を用いれば, 中程度の口臭の臭気物質は短時間で除去可能と思われる.

得られた試料 0.1 g を 150 ml の超純水に投入すると, 溶出した亜鉛量は 0.1 mg/150 ml 以下であった. 1.0 g の試料を用いると 1 時間後に 0.8 mg/150 ml の溶出量が測定された. ZnS の溶解度積と硫化水素の解離による硫化物イオン濃度から, ZnS に関し過飽和であるが, XRD と EDX から ZnS の析出は確認できなかった.

硫化水素水に浸漬後の試料の FT-IR スペクトルは, 浸漬前と比較して, 層間水, 層間水とアニオンの水素結合に対応する吸収ピーク強度が低下し, 層間水の減少を示唆している.

以上より, 亜鉛を含む層状複水酸化物は硫化水素水中の硫化物を速やかに吸着し, 水溶液中でわずかに溶解するが, 遊離の H₂S 及び HS⁻が, 亜鉛を含む層状複水酸化物の層間に速やかに置換・吸収されるため, 硫化物として析出しなかったと考えられる. 亜鉛を含む層状複水酸化物は, 口腔中の硫黄化合物を吸着により, 速やかに除去できる素材として有望であると思われる.

An Adsorptive Behavior of VSCs on Layered Double Hydroxide containing Zinc and Its Dissolution in Aqueous Solution

Yoshiyuki YOKOGAWA¹, Kodai KAKEHASHI¹, Hidemitsu WAKABAYASHI¹, Kazuki OIKE², Yuki MORITA², Kazuo FUJII², Yutaka DOI², Harumi KAWAKI², Masato HOTTAA²,

¹Graduate School of Engineering, Osaka City University ²School of Dentistry, Asahi University

Tel: +81-6-6605-2743, Fax: +81-6-6605-2743, E-mail: yokogawa@imat.eng.osaka-cu.ac.jp

RNA アプタマーを用いた新規骨再生用材料の in vivo 性能評価

¹国立医薬品食品衛生研究所、²東京大学、³株式会社リボミック、⁴東京大学医科学研究所
 ○野村祐介¹、藤澤彩乃²、松下幸平¹、豊田武士¹、福井千恵¹、森下裕貴¹、小川久美子¹、鄭 雄一²、中村義一^{3,4}、齋島由二¹

【緒言】医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。通常、蛋白質吸着は受動的であり、医用材料の物性に依存するが、その吸着挙動を人為的に制御することにより、意図した機能を医用材料に付与できる可能性が高い。近年我々は、生理活性を保持した状態でBMP2を能動的に捕捉するRNAアプタマー（RNA-AP）固定化材料が *in vitro* 骨芽細胞分化促進効果を発揮することを見出した。本研究では、RNA-AP を利用した新規機能性医用材料の有効性・安全性評価法開発を目指し、BMP2 捕捉型 RNA-AP 含有コラーゲンシートの性能をラット頭蓋骨埋植試験により評価した。

【実験】埋植材料は、RNA-AP 及び BMP2 を単独もしくは混合した溶液をメドジェル（5 mm×5 mm）に各々含浸させて調製した。陰性対照としては、PBS を用いた。実験動物には、7 週齢の Fischer 系雄ラット（各群 3 匹）を用いた。ラット頭蓋骨の窩洞は、三種混合麻酔下で背位に固定し、頭部正中皮膚を 3 cm 切開して骨膜を鈍的に剥離した後、歯科用エンジンをを用いて頭頂骨の両側に 5 mm×5 mm の骨欠損として形成した。窩洞部分に上記の各埋植材料を被覆した後、皮膚縫合した。材料埋植後、2 週で動物を屠殺し、 μ CT 測定後に埋植材を頭蓋骨組織と共に摘出した。得られた μ CT 画像から Image J を用いて頭蓋骨修復面積の解析を行った。摘出した組織試料は、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、脱灰処理後、常法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的解析を行った。

【結果と考察】埋植 2 週後の μ CT 画像解析において、陰性対照である PBS 群にも頭蓋骨再生が観測されたが、PBS 群<BMP2 添加群<BMP2/RNA-AP 添加群の順に再生率が増加した(図 1)。同様に、病理組織学的所見においては全ての群で埋植部位に線維性被膜の形成と骨組織の新生が観測されたが、BMP2 添加群及び BMP2/RNA-AP 添加群は陰性対照群と比較して骨組織の新生は有意に増加した。 μ CT 解析及び病理組織学的解析ともに、BMP2/RNA-AP 添加群は BMP2 単独群よりも優れた新生骨形成能を示した。これらの成績は、*in vitro* 性能評価試験結果と同様であり、当該材料は *in vitro* 及び *in vivo* を問わず BMP2 を捕捉して意図した機能を発揮することが明らかとなった。今後、FGF2 捕捉型 RNA-AP との併用も考慮して、新たな有効性・安全性評価法の開発を進める。

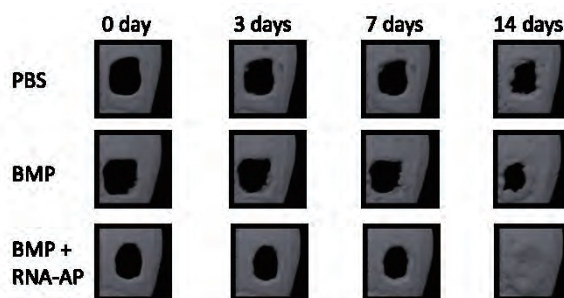


図 1.各試料含浸材料のラット頭蓋骨埋植試験結果

In vivo performance evaluation of novel biomaterial using RNA aptamer for bone regeneration

Yusuke Nomura¹, Ayano Fujisawa², Kohei Matsushita¹, Takeshi Toyoda¹, Chie Fukui¹, Yuki Morishita¹, Kumiko Ogawa¹, Ungil Chung², Yoshikazu Nakamura^{3,4}, Yuji Haishima¹

¹ National Institute of Health Sciences, ² University of Tokyo, ³ Ribomic Inc., ⁴ Institute of Medical Science, University of Tokyo

Tel: +81-44-270-6540, Fax: +81-44-270-6611, E-mail: haishima@nihs.go.jp

1E-01

双性イオン含有 PEDOT を用いた導電性と耐汚れ性を有する表面の創製

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所○合田 達郎¹, 宮原 裕二¹

【緒言】 導電性高分子 Poly(3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT)) (PEDOT)はバイオセンシングやバイオエレクトロニクス分野への応用が注目されているが、そのためには標的分子認識能や生体分子との非特異的相互作用を抑制する機能が不可欠である。生体分子や細胞との非特異的な相互作用を抑制するホスホリルコリン(PC)・スルフォベタイン(SB)・カルボキシベタイン(CB)といった双性イオンを有する有機材料の医用高分子への応用が注目されている。近年、これら双性イオンを側鎖に持つ EDOT 誘導体が開発されているが、合成ルートが煩雑であり、実用化する際の大量合成が困難であると予想される。そこで、我々は thiol-ene クリック反応を用いた簡便な合成法により双性イオン型 EDOT を作製した。これら誘導体と EDOT との共重合体を合成し、導電性と耐汚れ性を兼ね備えた表面の創製をおこなった。

【実験】 既報に従い EDOT 側鎖に thiomethyl 基が導入された分子 EDOT-SH を合成した(Fig. 1)[1]。thiol-ene 反応は 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)、carboxybetaine methacrylate (CBMA)、または sulfobetaine methacrylate (SBMA) と EDOT-SH を diisopropylamine 存在下で 24 時間 50°C にて進行させ、分液と再沈による精製後に ¹H-NMR によって EDOTPC、EDOTCB、EDOTSB をそれぞれ同定した。共重合反応は 10 mM モノマーと 100 mM 過塩素酸ナトリウム（ドーパント）溶液中でサイクリックボルタンメトリーを用いた電解重合によって進行させ、得られた薄膜は ATR-FTIR や XPS、

静的な水接触角、膜厚測定によって同定した。電気化学インピーダンス測定は、5 mM ヘキサシアノ鉄(II)/(III)カリウム水溶液中でおこない、等価回路を用いて解析をおこなった。10%および 100%血清中のタンパク質吸着量を QCM にて測定した。NIH/3T3 と HepG2 細胞を用いて細胞接着挙動を評価した。

【結果と考察】 インピーダンスは双性イオンモノマー含率が高くなるにつれて高くなった[2]。同率組成では EDOTPC を含む導電性高分子が最も低い電荷移動抵抗値を示した。双性イオン基を含む導電性高分子へのタンパク質吸着量は元の PEDOT への吸着量に対して有為に低く、双性イオンの含率が高くなるに従いその効果は顕著であった。仕込み組成 50 mol%における EDOTPC と EDOTSB を含む表面は EDOTCB のそれと比べて耐汚れ性が良好であった。これらの表面では、NIH/3T3 細胞や HepG2 細胞の接着はほぼ完全に抑制された。EDOTPC は EDOTSB や EDOTCB と比べて親水的であり、耐汚れ性の発現機構が異なることが示唆された。

【参考文献】

[1] T. Goda *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7, 27440.[2] T. Goda *et al.*, *Langmuir*, **2018**, *In press*. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01492.

Development of Zwitterionic Conducting Polymer Surfaces with Low-impedance and Anti-fouling Properties

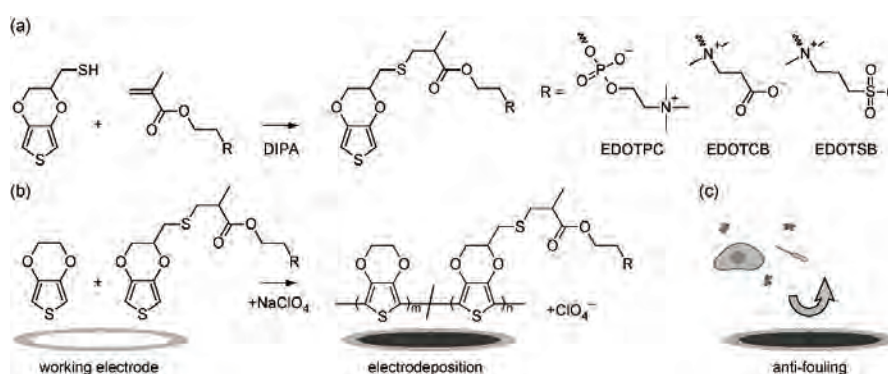
Tatsuro Goda¹, Yuji Miyahara¹¹Dainstitute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental UniversityTel: +81-3-5280-8097, Fax: +81-3-5280-8135, E-mail: goda.bsr@tmd.ac.jp

Fig. 1. Synthesis of antifouling and conducting polymer films. (a) Synthesis of zwitterionic EDOTs via thiol-ene reaction. (b) Electrodeposition of zwitterionic EDOTs and EDOT. (c) Schematic diagram of antifouling properties of electrodeposited zwitterionic PEDOT films.

AFM 化学修飾探針を用いたフィブリノーゲンとその受容体との相互作用評価

¹ (株) 東レリサーチセンター 表面科学研究部,

² 東レ (株) 医薬研究所, ³ 東レ (株) 先端材料研究所

○村司 雄一¹, 古賀 陽子², 上野 良之³, 藤枝 洋暁³

【緒言】東レ (株) 製品である人工腎臓トレライト®はポリスルホン中空糸膜を使用しており、透析と濾過の原理で老廃物を除去している。人工腎臓に用いられる中空糸膜は臨床使用時に膜表面へ血小板が付着すると、ファウリングによる除去性能低下や膜目詰まりにより使用不可能となる場合があり、膜表面への血小板付着を抑制することが求められる。血小板は血漿由来のフィブリノーゲンにその受容体を介して活性化・吸着するため、高い血小板付着抑制効果はフィブリノーゲン吸着量の少なさによって得られることを我々は突き止めた。しかし、血小板の付着には、フィブリノーゲンの吸着量だけでなく、フィブリノーゲンの血小板付着部位が表出しているかも重要であるため、液中で微小部位を観察・評価可能という特徴をもつ原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、吸着したタンパク質の血小板付着部位が表出しているかを評価・解析する技術の確立を試みた。また、その技術をポリスルホン上フィブリノーゲンに適用した。

【実験】SiN カンチレバー (Bruker 社製、バネ定数: 0.05 N/m (公称値)) を酸処理、シランカップリング処理後、フィブリノーゲン受容体タンパク質である GPIIb/IIIa の Tris-HCl バッファー溶液に浸漬し、フィブリノーゲン受容体 (GPIIb/IIIa) を導入した AFM 化学修飾探針を作製した。

試料は 3 検体 [①フィブリノーゲンを吸着させたマイカ基板 (モデル実験)、②フィブリノーゲンを吸着させたポリスルホン、③アルブミンを吸着させたポリスルホン (①~③とも、37°C、Tris-HCl バッファー中でタンパク質をインキュベーション)] を準備し、作製した化学修飾探針または未修飾探針を用いて、Tris-HCl バッファー中で AFM フォースカーブ法により相互作用 (吸着力) を評価した。

【結果と考察】①フィブリノーゲンを吸着させたマイカ基板では、化学修飾探針 (フィブリノーゲン受容体修飾探針) では吸着力が認められたのに対し、未修飾探針では吸着力が認められなかった。このことから、フィブリノーゲン受容体は探針に問題なく導入されたと考えられる。

②フィブリノーゲンを吸着させたポリスルホンでは、化学修飾探針では吸着力が認められたのに対し、未修飾探針では吸着力が認められなかった。また、③アルブミンを吸着させたポリスルホンでは、化学修飾探針でも吸着力は認められなかった (測定の模式図および得られたフォースカーブを Fig.1 に示す)。以上より、検出された吸着力は、フィブリノーゲンとその受容体である GPIIb/IIIa との相互作用 (リガンド-レセプター結合) を反映していると推察される。

本結果より、AFM 化学修飾探針の作製、および、吸着タンパク質の血小板付着部位の表出を解析する技術の確立に成功した。なお、AFM 形態観察によるフィブリノーゲンの膜への吸着状態評価や、ブロッキング実験によるリガンド-レセプター結合の検証なども含めて当日報告する予定である。

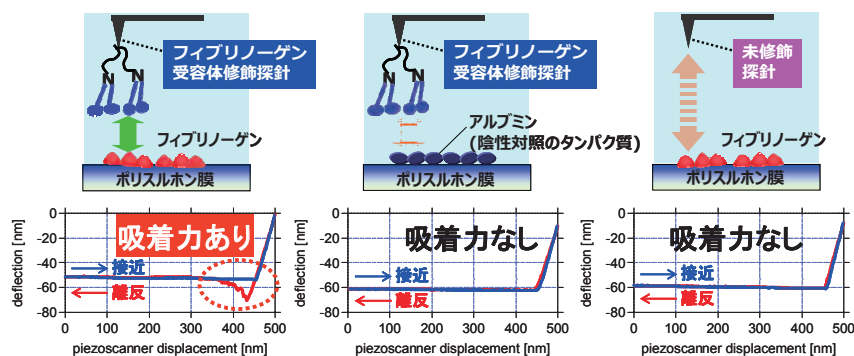


Fig.1 Schematic illustrations of respective AFM measurement and its force curve.

AFM measurements of interactions between fibrinogen and its receptor with chemically modified probe

Yuichi Muraji¹, Yoko Koga², Yoshiyuki Ueno³, Hiroaki Fujieda³

¹Surface Science Laboratory, Toray Research Center, Inc., ²Pharmaceutical Research Laboratory, Toray Industries, Inc., ³Advanced Materials Laboratory, Toray Industries, Inc.

Tel: +81-77-533-8599, Fax: +81-77-533-8628, E-mail: Yuichi_Muraji@trc.toray.co.jp

種々のアニオン性デンドリマーによるリンパ節の蛍光イメージング

¹大阪府立大学大学院工学研究科, ²北海道大学大学院薬学研究院○長島 舟¹, 西本 豊¹, 大平 貴之², 中島 孝平², 富田 真由², 小川 美香子², 児島 千恵¹

【緒言】

センチネルリンパ節は転移性がん細胞が最初に到達するリンパ節のことであり、センチネルリンパ節の検出はがん診断において重要である。デンドリマーは粒径・表面電荷の制御が容易な高分子ナノ粒子であり、末端官能基に様々なプローブを結合できることから、多機能性ナノキャリアとして有用とされている。我々は、これまでに様々な粒径をもつカチオン性、アニオン性、ノニオン性のデンドリマーを作製し、リンパ節移行性を検討したところ、アニオン性で第4世代(G4)以上のデンドリマーが高いリンパ節移行性を持つことを報告した[1]。以前の研究では、アニオン性デンドリマーとしてカルボン酸末端のデンドリマーを用いたが、硫酸、リン酸末端のデンドリマーもアニオン性デンドリマーとして機能すると考えられる。そこで本研究では、蛍光標識した様々なアニオン性末端のデンドリマーを合成し、リンパ節の蛍光イメージングを行った。また、フローサイトメトリー (FCM) によって、リンパ節内の様々な免疫細胞との相互作用について検討した。

【実験】

アミノ末端の第5世代(G5)のポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマーにHyLite Fluor 488を3分子結合した。次に、無水コハク酸、1,3-プロパンスルホン、シクロ3リン酸ナトリウム塩を反応させ、それぞれカルボン酸(C)、硫酸(S)、リン酸(P)末端のデンドリマーを合成した[1-3]。これらのデンドリマーを8週齢のBALB/cマウスの手足に皮内投与し、4時間後に蛍光イメージングを行った。また、このリンパ節を摘出して、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージをCD45R-PE、CD3-PE、CD11c-PE、F4/80-PEでそれぞれ染色し、FCMによってそれぞれの細胞に対するデンドリマーの細胞取り込みについて調べた。

【結果と考察】

デンドリマーへのカルボン酸、硫酸、リン酸部位の導入は、NMRスペクトルによって確認した。いずれのデンドリマーでも、膝窩リンパ節を蛍光イメージングすることができた(図1)。

FCMの結果から、リンパ節にはB細胞が約70%、T細胞が約30%存在し、樹状細胞及びマクロファージがわずかに存在していると見積もられた。リン酸末端デンドリマーは、リンパ節に存在する細胞に取り込まれており、B細胞、樹状細胞、マクロファージで取り込まれていた。一方、カルボン酸末端デンドリマーや硫酸末端デンドリマーはほとんど免疫細胞に取り込まれていないことがわかった。

以上より、アニオン性末端のデンドリマーはいずれもリンパ節に集積するが、その集積機構が異なることが示唆された。

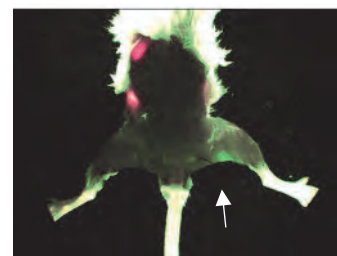


Figure 1. Fluorescence imaging of lymph node by using fluorescent S-terminal dendrimer. The arrow indicates the lymph node.

[1] Y. Niki, M. Ogawa, R. Makiura, Y. Magata, C. Kojima. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. **11** (2015) 2119-2127.

[2] Hui-Ting Chen et al. *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 10044-10048.

[3] H. Maeda et al. *Phosphorus Research Bulletin*. **23** (2009) 52-56.

Fluorescence imaging of lymph nodes by using various anionic PAMAM dendrimers

Shu Nagashima¹, Yutaka Nishimoto¹, Takayuki Ohira², Kohei Nakajima², Mayu Tomita², Mikako Ogawa², Chie Kojima¹

¹Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

Tel: +81-72-254-8190, E-mail: kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

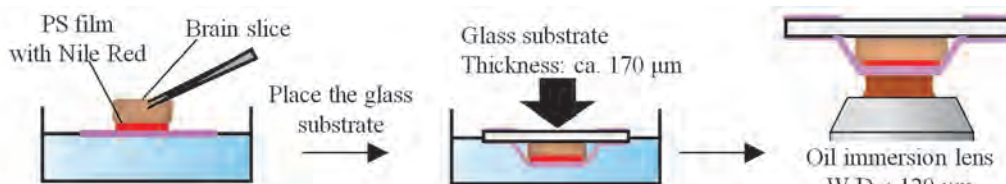
撥水性超薄膜を活用したカバーガラスフリー生体深部イメージング法の提案

¹東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, ²東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター, ³北海道大学電子科学研究所, ⁴愛媛大学大学院医学系研究科

○岡村 陽介^{1,2}, 張 宏², 鎗野目 健二¹, 高橋 泰伽³, 大友 康平³, 川上 良介⁴, 根本 知己³

【緒言】厚みをナノ寸法(100 nm 以下)に制御した高分子超薄膜は、ナノ厚特有の高接着性が発現し、接着剤なしで様々な界面に貼付できる¹⁾。最近、フッ素含有高分子(CYTOP)からなる撥水性超薄膜の開発に成功し、生体組織をラッピングすることで乾燥を防ぐことを実証した²⁾。しかし、カバーガラスを介して組織を可視化するのが常套手段であるため、組織とカバーガラスの屈折率の相違による球面収差の課題に直面したり、カバーガラスの厚み相当、対物レンズの作動距離は低下する。本研究では、カバーガラスの厚さより 1/1000 薄い撥水性超薄膜を創製し、カバーガラスフリーの生体深部イメージング法を提案する。

【実験】SiO₂基板(40 × 40 mm)上にポリビニルアルコール水溶液(PVA, 10 mg/mL)をスピコート(4,000 rpm, 20 s)し犠牲層とした。次いで、アモルファスフッ素系ポリマー(CYTOP®)溶液(30 mg/mL, 旭硝子社製)を同条件にてスピコートした。基板ごと純水に浸漬させてPVA犠牲層を溶解させ、撥水性超薄膜を得た。透明化試薬にて透明化したマウスの脳切片に対し、蛍光(Nile Red)入りポリスチレンフィルム(PS, 膜厚: ca. 1 μm)を貼付した。剥離した撥水性超薄膜の上に脳切片・カバーガラスの順に乗せてラッピングし、共焦点レーザー顕微鏡(60x 油浸レンズ, CFI Apochromat TIRF, N.A.: 1.49)にて深部イメージングを行った(Scheme 1)。



Scheme 1. Wrapping method of tissues with water-repellent nanosheet and coverslip-free deep tissue imaging.

【結果と考察】SiO₂基板上に水溶性高分子のポリビニルアルコール水溶液(PVA, 10 mg/mL)、CYTOP溶液(30 mg/mL)の順にスピコートし、撥水性超薄膜(膜厚: 122 ± 5 nm)を調製した。その後、剥離した撥水性超薄膜の上に透明化した脳切片、カバーガラスの順に乗せてラッピングし、共焦点レーザー顕微鏡にてイメージングを行った(Scheme 1)。従来のカバーガラスを介した場合、対物レンズの作動距離相当(ca. 120 μm)の深さに位置する神経細胞は観察可能であったのに対し、超薄膜を介した場合、カバーガラスの厚み(ca. 170 μm)を加えた 300 μm 付近まで高解像度に可視化できることを実証した。以上より、超薄膜を用いた生体深部イメージングに成功した。現在、屈折率を鑑みたイメージングを検討しており、当日併せて報告する。

【参考文献】1) Y. Okamura *et al.* *Adv. Mater.* **21**, 4388 (2009). 2) H. Zhang *et al.* *Adv. Mater.* **29**, 1703139 (2017).

【謝辞】本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「共鳴誘導で革新するバイオイメージング」、物質・デバイス領域共同研究拠点 H29, 30 年度展開共同研究 A (北海道大学)、文部科学省私立大学戦略的基盤形成支援事業「高分子超薄膜から創成する次世代医用技術」、の助成により行われた。

Fabrication of water-repellent nanosheets for coverslip-free deep tissue imaging

Yosuke Okamura^{1,2}, Hong Zhang², Kenji Yarinome¹, Taiga Takahashi³, Kohei Otomo³, Ryosuke Kawakami⁴, Tomomi Nemoto³

¹Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University. ²Micro/Nano Technology Center, Tokai University. ³Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University. ⁴Ehime University Graduate School of Medicine.

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

DNA 損傷剤の目視探索を目指した DNA 密生型金ナノ粒子の分子設計

¹東理大院基礎工, ²東理大基礎工教養, ³理研前田バイオ工学
○木村 和徳¹, 秋山 好嗣², 宝田 徹³, 前田 瑞夫³, 菊池 明彦¹

【緒言】二重鎖 (ds) DNA を高密度に固定化した金ナノ粒子 (dsDNA-GNP) は, ユニークかつ優れた界面特性をもつことから, 基礎と応用の両面から関心が持たれている。これまでに, 前田らは dsDNA-GNP の末端塩基対合に依存した非架橋的な凝集現象を報告している[1]。最近, dsDNA-GNP の表層部が一塩基突出構造をもつとき, ミスマッチ鎖と同様に, 高イオン強度下において粒子は凝集することなく, 分散状態を保持することを見出した[2]。本研究は, 薬効メカニズムに DNA 切断を発現する化合物の目視探索への展開を目指した新たな分子設計に着目した。すなわち, 抗腫瘍性抗生物質として知られるブレオマイシン (BLM) の切断 (5'-GC-3') 部位を dsDNA に導入し, 切断経路を目視識別できる簡易診断システムの構築を目的とした。

【実験】既報[1]にしたがい, dsDNA (18 塩基対) を GNP (粒径 15 nm) に固定化し, 鉄イオンで活性された BLM(Fe(II)-BLM) の切断部位を表層部に有する dsDNA-GNP を調製した。この dsDNA-GNP 分散液に, Fe(II)-BLM (最終濃度 62.5 $\mu\text{mol/L}$) を加え, ついで, NaCl (最終濃度 0.5 mol/L) を添加した。対照サンプルとして, BLM とは異なる切断認識 (5'-GT-3') を示すメトロニダゾール (MTZ) を用いた (Figure 1)。得られた dsDNA-GNP 溶液のコロイド安定性を, 表面プラズモン共鳴シフトに基づく色調変化から解析した。

【結果と考察】DNA 損傷剤で処理した dsDNA-GNP 分散液に, NaCl を添加して, 室温で 10 分間静置させた。Fe(II)-BLM では, 分散状態に由来する赤色を保持した (Figure 1 上段)。一方, BLM とは異なる切断開裂を示す MTZ は, dsDNA-GNP の凝集状態に由来する紫色が観察された (Figure 1 下段)。MTZ で処理した dsDNA-GNP は, MTZ が開裂する配列を持たないため DNA の開裂はおきず, 完全相補な二重鎖が保持された結果, 非架橋凝集が誘起されたと考えられた。Fe(II)-BLM では, dsDNA-GNP の末端配列が切断されると, 粒子の表層部に突出構造が形成され, 高塩濃度下においても粒子の凝集を抑制できたことが示された。以上のことから, BLM の特異的な DNA 切断活性を目視で検出できるアッセイ系の構築に成功した。今後, DNA 切断をナノ界面制御につなげる本マテリアル設計は, 様々な DNA 親和性薬物の目視探索への応用展開が期待できる。

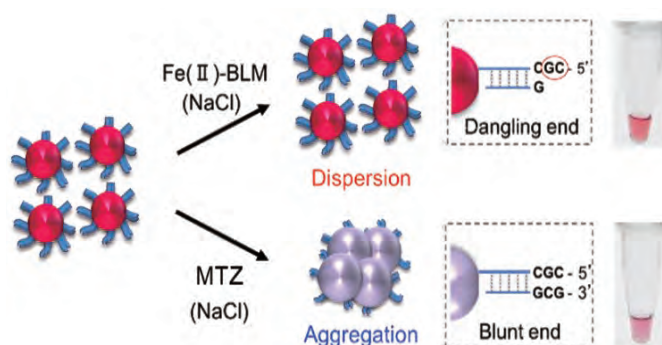


Figure 1 Colorimetric assay of sequence specific BLM-mediated DNA Cleavage based on dsDNA-GNP with a dangling end.

【参考文献】 [1] K. Sato *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8102. [2] Y. Akiyama *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 17420.

Molecular Design of Double-Stranded DNA-Modified Gold Nanoparticles for Colorimetric Assay of DNA Damaging Agents

Kazunori Kimura¹, Yoshitsugu Akiyama², Tohru Takarada³, Mizuo Maeda³, Akihiko Kikuchi¹

(¹Dept. Mater. Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Sci., 6-3-1 Niiijuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan, ²Fac. of Ind. Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Sci., 102-1 Tomino, Oshamambe-cho, Yamakoshi-gun, Hokkaido 049-3514, Japan, ³Bioengineering Laboratory, RIKEN, 2-1 HiroSawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan) ²Tel: +81-1377-2-2803, E-mail: yoshitsugu.akiyama@rs.tus.ac.jp

カチオン化ゼラチンナノ粒子を用いたモレキュラービーコン細胞内徐放

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

【緒言】

細胞移植治療において、生体内に移植された細胞の生物機能を非侵襲かつ経時的にイメージングすることは重要である。モレキュラービーコン (MB) は、両末端に消光分子と蛍光分子が結合した核酸誘導体であり、細胞内で様々な生物機能を制御する mRNA を汎用的に検出することができる。しかしながら、単独の MB は細胞内に導入されにくく、既存の遺伝子導入試薬・方法論では細胞内の MB 活性が一過的であると考えられる。生体吸収性高分子であるゼラチンからなるハイドロゲルは、生体内の酵素によって分解され、核酸などの生理活性物質を徐放できることが知られている。そこで本研究では、マウスのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA に対する MB を設計し、これを内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子を作製した。さらに、ナノ粒子と比較するために、カチオン化ゼラチン-MB 複合体も作製した。これらを細胞に取り込ませ、細胞内における MB の徐放性を評価するとともに、経時的に細胞内 mRNA のイメージングを行った。

【実験】

ゼラチン (等電点 9.0、重量平均分子量 100,000、新田ゼラチン株式会社より供与) のカルボキシル基に対して、スベルミンを結合させることでカチオン化ゼラチンを作製した。次に、カチオン化ゼラチン水溶液にアセトンを追加することでコアセルベーションを形成させた。その後、異なる量のグルタルアルデヒド (GA) 水溶液を添加し、異なる架橋度と分解性をもつカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS) を得た。得られたナノ粒子と MB を混合し (20 pmole/ μ g、15 分間、室温)、遠心分離によって MB 内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{MB}) を調製した。また、カチオン化ゼラチン-MB 複合体 (complex) は、カチオン化ゼラチン水溶液と MB を混合 (15 pmole/ μ g、15 分間、室温) することで作製した。complex および cGNS_{MB} の見かけのサイズとゼータ電位は、動的光散乱法および電気泳動光散乱法によりそれぞれ測定した。

マウス間葉系幹細胞 (KUM6) を 6 well plate に 5×10^4 cells/well の密度で播種、24 時間培養し、無血清培地に交換後、complex あるいは cGNS_{MB} を細胞毒性の無い濃度 (5 μ g/ml) で細胞に取り込ませた (day 0)。さらに培養を続け、経時的に蛍光顕微鏡で観察するとともに、トリプシン処理にて細胞をはがし、あらかじめ 125 I により標識した MB の放射活性から MB の細胞内残存量を測定した (day 1、2、3、5、7、9、および 14)。

【結果と考察】

得られた cGNS_{MB} および complex の見かけのサイズは 220~250 nm であり、ゼータ電位はいずれも正であった。cGNS_{MB} および complex を細胞に取り込ませ、経時的に蛍光顕微鏡で観察したところ、complex では day 2 以降ほとんど蛍光が観察されなかった。これに対して cGNS_{MB} は、作製時の添加 GA 量の増加とともに、より長期にわたって蛍光が観察された。また、細胞内に残存する MB 量の割合を測定した。その結果、day 1 における complex は 12%であったのに対して、cGNS_{MB} では 53~65%の残存であった。さらに、ナノ粒子作製時の GA 量に依存して、MB の細胞内残存期間は延長した。これは、細胞内でカチオン化ゼラチンナノ粒子の分解にともなって、MB が徐放されたためである。このように、ナノ粒子の架橋度を制御することで、MB の徐放性および細胞内残存期間を制御することができると考えられる。

Intracellular release of molecular beacon with cationized gelatin nanospheres

Yuki Murata, Jun-ichiro Jo, and Yasuhiko Tabata

Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Tel: +81-75-4108, Fax: +81-75-4646, E-mail: murata.yuki.63v@st.kyoto-u.ac.jp

Biodegradable cross-linked networks based on poly(trimethylene carbonate)

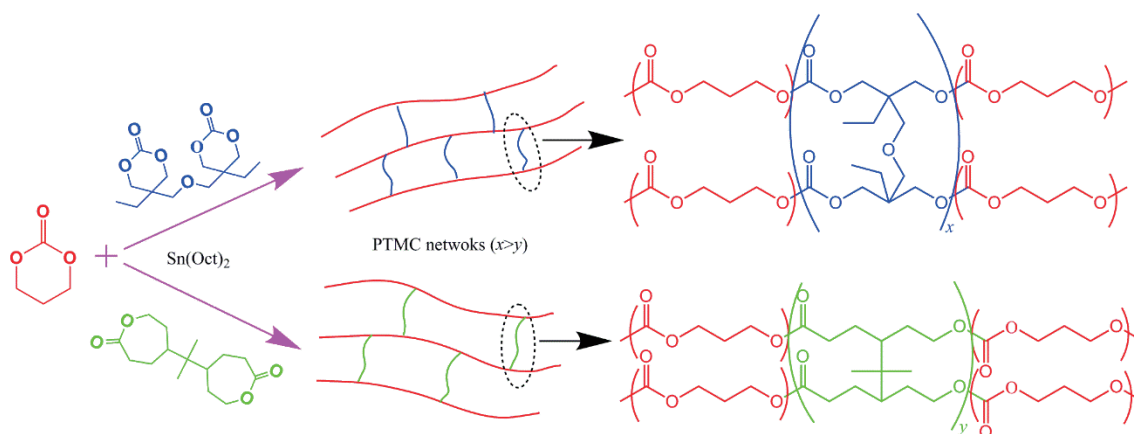
¹ Liaoning Research Institute of Family Planning, China Medical University; ² Key Laboratory of Reproductive Health and Medical Genetics, National Health Commission of China; ³ Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University; ⁴ National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, China

○Liqun Yang ^{1,2,3}, Jianxin Li ^{1,2}, Zhongwei Gu ⁴

E-mail: yanglq@lnszjk.com.cn

【Introduction】 In recent years, poly(trimethylene carbonate) (PTMC) has attracted considerable attention for biomedical and pharmaceutical applications due to its favorable characteristics, such as well-documented biocompatibility, excellent biodegradability and rubber-like properties. However, further study showed poor compatibility between degradation rate and form-stability of PTMC during the in vivo degradation, for example, although the degradation rate was slow, the form-stability for low-molecular-weight PTMC was poor; while the form-stability was enhanced, high-molecular-weight PTMC had an undesired faster degradation rate in vivo. It would greatly hinder the extensive application of PTMC in biomedical fields. The exact combination of good form-stability and low degradation rate of PTMC needs to be achieved urgently. Biodegradable cross-linked networks (BCNs) have become increasingly important and gained popularity in biomedical applications for their stability and structural integrity across an extended time period. Herein, we reported the synthesis and in vitro enzymatic degradation behavior of the PTMC-based BCNs.

【Experiment】 The PTMC-based BCN rods were directly synthesized via bulk ring-opening polymerization reaction of TMC with cross-linker bis(trimethylene carbonate) (BTB) or bis(ϵ -caprolactone) (BCP) in the mold of Teflon tubes with an inner diameter of 3 mm. The in vitro degradation of PTMC-based BCN rods was performed in lipase solutions (from *Thermomyces lanuginosus*, $\geq 100,000$ U/g) at 37°C with gentle shaking. At regular time intervals, the samples were taken out from the degradation media and washed with distilled water. After blotted with a tissue, the specimens were weighted and then vacuum dried at 37°C to a constant weight for further analysis, and the diameter of the dried specimens was recorded. The pH of the media containing degradation products was also measured.



Scheme 1 Representation of the formation of PTMC-based BCNs prepared by cross-linking

1E-07

【Results and Discussion】 The results showed that BTB had high reactivity and efficiency to form stable polymeric networks with high gel percentage, high decomposition temperature and good mechanical properties. These obtained PTMC-based BCNs were amorphous and elastic, and the glass transition temperatures were below physiological temperature (37 °C), which were expected to be rubbery for in vivo applications. The properties of PTMC-based BCNs could be predictably controlled and tailed by varying the polymer composition and cross-linker amount as well as the initial molecular weight. The properties of the PTMC-based BCNs cross-linked by (BTB) were similar to that of counterparts cross-linked by BCP, indicating that BTB can be used interchangeably with BCP. Through in vitro enzymatic degradation, the 0.05mol% BTB cross-linked PTMC-based BCNs displayed a mass loss of 34% and an erosion rate of 6.94 $\mu\text{m}/\text{d}$ after 12 weeks—this was markedly slower than that of the uncross-linked samples. The degradation of PTMC-based BCNs was dependent on the initial molecular weight. Higher mass loss and subsequent higher degradation rate were detected for PTMC-based BCNs with higher initial molecular weight at a given cross-linker amount. The degradation rate of PTMC-based BCNs also could be tailored by the adjustment of cross-linker amount, the higher the cross-linker amount, the slower the degradation rate. Furthermore, PTMC-based BCNs presented better form-stability versus the non-crosslinked ones during the enzymatic degradation, indicating that cross-linking was an effective strategy to enhance the form-stability and lower the degradation rate of PTMC. PTMC-based BCNs has potential in clinical applications, such as subcutaneous implants, etc.

γ -シクロデキストリンの枝分かれグリセロール修飾による超分子集合体サイズ制御

¹神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻
山本一裕¹, ○大谷 亨¹

【緒言】シクロデキストリン(CD)の中でも最も水溶性に優れている γ -CD は、医療分野における超分子集合体への展開が期待されるが、 10^3 M^{-1} 以上の結合定数を有するゲスト分子の報告例が極めて少なく、新たな組み合わせが切望される。われわれは、 γ -CD の新奇ゲスト分子としてカオトロピック性を有する Dodecaborate に着目している。Dodecaborate とは分子式 $\text{B}_{12}\text{X}_{12}^{2-}$ ($\text{X} = \text{H}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) で表される二価の無機アニオンであり、近年ではがん治療において中性子捕捉療法に用いられている。特に γ -CD と $\text{B}_{12}\text{Br}_{12}^{2-}$ の結合定数は $9.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり¹⁾、新たな超分子集合体を構築するホスト-ゲストの組み合わせとして期待できる。本研究では、 γ -CD と Dodecaborate を用いた超分子集合体の構築を試みた。 γ -CD と Dodecaborate への化学修飾デザインを検討することで、超分子集合体の形成およびサイズ制御の可能性について考察した。具体的には、 γ -CD に Hyperbranched polyglycerol (HPG) を修飾した HPG-g- γ -CD と、Dodecaborate にアルキル鎖を導入した $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{Br}_{11}\text{O}-\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ (DB-C₁₂) を合成し、これら包接体及び水媒体中での超分子集合体形成について評価した。

【実験】DB-C₁₂, HPG-g- γ -CD の合成: 水中に溶解した $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$ に H_2SO_4 を加えて $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{OH}$ を調製した後、臭素化し、 $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{Br}_{11}\text{OH}$ を得た。これと、KOH 存在下、DMSO 中で $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-Br}$ と反応させることにより DB-C₁₂ を合成した。これらの合成の確認を、¹H-,¹¹B-NMR, ESI-MS 測定から行った。また、 γ -CD に 15-crown-5-ether, NaH 存在下にてグリシドールを滴下し、その滴下速度によって分子量の異なる HPG-g- γ -CD ($M_n=4\text{k}$), ($M_n=7\text{k}$) を得た。合成の確認を MALDI-TOF-MS, ¹H-NMR 測定から行った。超分子集合体の調製と解析: 1 mg/ml の DB-C₁₂ に対して γ -CD, HPG-g- γ -CD (4k), (7k) を加え、それぞれの溶液に対して Scanning Transmission Electron Microscope (STEM)-EDS 観察、動的光散乱 (DLS) 測定を行った。さらに ¹H-NMR・ROESY、等温滴定型カロリメトリー (ITC) 測定を行った。

【結果と考察】STEM 観察の結果、 γ -CD + DB-C₁₂ の混合系では粒子のような構造体は観察されなかったのに対して、HPG-g- γ -CD ($M_n=4\text{k}$) + DB-C₁₂ 混合系では 160 nm の粒子が見られ、HPG-g- γ -CD ($M_n=7\text{k}$) + DB-C₁₂ 混合系では、約 1,000 nm の粒子が見られた。水溶液中での粒径を DLS から算出したところ、どちらの混合系でも 80-90 nm であった。このことから、HPG 分子量の増加に伴い、水酸基間の水素結合性が增大する傾向が見られた。ITC 測定から包接体形成比を算出した結果、いずれもほぼ 1:1 の包接体形成であった。一方、ROESY 測定から、HPG 修飾がない場合、 γ -CD 空洞内部へは DB-C₁₂ のアルキル鎖部分が包接され、HPG 修飾すると γ -CD 空洞部へは Dodecaborate 部位が包接されていると示唆された。さらに、HPG-g- γ -CD+DB-C₁₂ に対して大過剰の α -CD を添加すると DLS によって算出した粒子径が減少する現象が見られた。これは DB-C₁₂ のアルキル部位を α -CD が包接することによる超分子集合体の崩壊を示唆しており、このことから超分子集合体における疎水性相互作用の寄与が示された (Fig. 1)。以上から、 γ -CD への HPG 修飾により、両親媒性分子としての特徴が誘発され、C₁₂ アルキル鎖間の疎水性相互作用によって 80-90nm の集合体を形成することが明らかとなった。

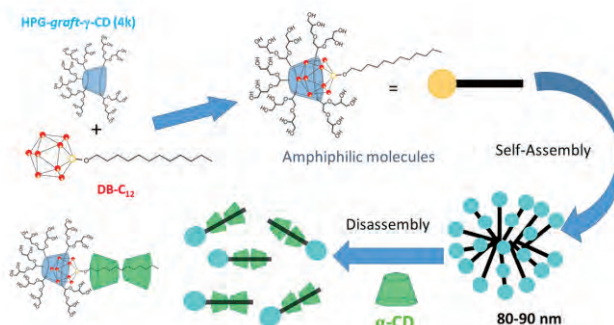


Fig.1 Proposed mechanism of the supramolecular assembly

Size Regulation of Supramolecular Assembly Consisting of Hyperbranched Glycerol-Modified γ -Cyclodextrin

Kazuhiro Yamamoto¹, 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

表面に PEG 鎖を導入した高分子ナノ粒子の設計と細胞への取り込み制御

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

【緒言】薬物治療において最適な量の薬物を目的部位で持続的に放出するためのシステムとしてドラッグデリバリーシステム (DDS) が盛んに研究されている。DDS において, がん組織付近に薬物キャリアを集積させるための方法として EPR 効果を利用した研究例が多く報告されている。EPR 効果を十分に発現するためにはキャリアが高い血中滞留性を有している必要があり, そのためにキャリア表面への poly(ethylene glycol) (PEG) の導入が注目されてきた。しかし, PEG を表面に導入することにより細胞への取り込みが阻害されることが報告されている。一方, われわれはこれまでに PEG 鎖導入型液晶高分子を用いた自己集合体の薬物キャリアへの応用を試みてきた。このキャリアは表面を PEG が覆っているにも関わらず正常細胞には取り込まれず, がん細胞には顕著に取り込まれることがわかった。この結果から, 粒子表面の PEG 鎖長および PEG 導入率などの粒子の表面特性が細胞への取り込みに影響していると考えた。本研究では, 粒子表面の特性が与える細胞取り込みへの影響を明らかにするため, 粒子表面の PEG 鎖長および PEG 導入率を変化させたさまざまな PEG 導入高分子ナノ粒子を調製した。さらに, それらを正常細胞またはがん細胞に接触させ, 粒子の表面特性と細胞への取り込み能との関係を検討した。

【実験】モノマーとして styrene (St) および poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA), 架橋剤として divinyl benzene, 蛍光物質として重合性基を持つ fluorescein *O*-methacrylate, 開始剤として ammonium persulfate を脱気した超純水に加え, 窒素雰囲気下, 85 °C で 6 時間, ソープフリー乳化重合することにより P(St-co-PEGMA)粒子を調製した。このとき数平均分子量 $M_n=330$ または 495 の PEGMA を用い, その含有率を 10 および 45 mol% として粒子を調製した。これらの粒子表面への PEG 導入を X 線光電子分光法 (XPS) によって確認した。さらに, P(St-co-PEGMA)粒子を正常細胞であるマウス線維芽細胞 (L929) およびがん細胞であるヒト肝癌由来細胞 (HepG2) に接触させ, フローサイトメトリーによって細胞への取り込みを評価した。

【結果と考察】調製した P(St-co-PEGMA)粒子はいずれも水中で安定に分散し, 動的光散乱測定の結果から粒径 100 nm 程度の単分散な粒子であることがわかった。また, XPS 測定による P(St-co-PEGMA)粒子の表面元素分析から, 粒子表面への PEG 導入を確認し, PEG 鎖長および PEG 導入率の異なる粒子を調製できることが明らかとなった。

Fig. 1 には, PEG 導入率が同程度で PEG 鎖長が異なる 2 種類の P(St-co-PEGMA)粒子を L929 に 4 h 接触させたときの細胞取り込み量を示した。Fig. 1 より PEG 鎖長が短い粒子 (PEGMA $M_n=330$) を接触させたときはコントロールよりも高い蛍光強度を示し, 細胞に取り込まれることがわかった。一方, PEG 鎖長が長い粒子 (PEGMA $M_n=495$) を接触させたときはコントロールと同様の位置にピークを示し, 細胞に取り込まれなかったと考えられる。これらの結果より, 粒子表面の PEG 鎖長を変化させることにより, 細胞への取り込みを制御できることが明らかになった。さらに, がん細胞への粒子の取り込み挙動を検討した結果も報告する。

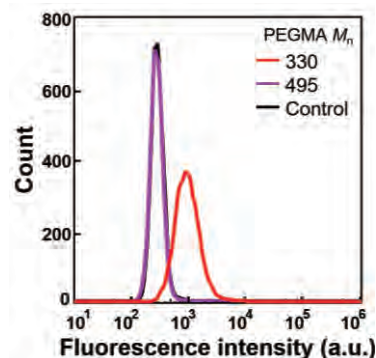


Fig. 1. Flow cytometry histogram profiles of L929 cells treated with P(St-co-PEGMA) particles with a PEG content of 14 mol% ($M_n=330$) and 16 mol% ($M_n=495$) at 37 °C for 4 h. The concentration of P(St-co-PEGMA) particles was 0.5 mg/mL.

Design of polymer nanoparticles with PEG chains on surface and control of their cellular uptake

Aoi Uozumi¹, Akifumi Kawamura^{1,2}, Takashi Miyata^{1,2}

¹Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering Kansai University, ²ORDIST, Kansai University
 Tel: +816-6368-0949, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: tmiyata@kansai-u.ac.jp

スルホベタインポリマーの肝細胞スフェロイドへの移行挙動解析

東北大学大学院工学研究科

○森本展行, 大石佳史, 山本雅哉

【緒言】

細胞の3次元培養から得られる細胞スフェロイドは、単層培養では得られない、より生体内に近い高い細胞活性を発現することから、薬物の毒性試験やスクリーニング、動物実験代替としての評価モデルの構築、再生医療などの多くの分野で注目されている。

我々は、正負の一対の荷電基を側鎖に有したスルホベタイン構造を有したモノマー 3-dimethyl(methacryloyloxyethyl) ammonium propanesulfonate (PDMAPS) と poly(ethylene glycol) monomethacrylate との共重合体、P(DMAPS-ran-PEGMA)を調製した。このポリマーが低細胞毒性であること、またがん細胞など単層培養した各種細胞に添加すると、数分内での部位非特異的な細胞内への移行やポリマー濃度との高い相関性を明らかとした。さらにエンドサイトーシス阻害条件でも細胞内移行量を低下させないことから、細胞膜透過の機構で細胞内へと移行すると考えている。細胞内において局在性を示さないフルオレセイン修飾では、ポリマーはオルガネラを含めた細胞全体に分布する。一方でオルガネラ指向性低分子を修飾すると、ポリマーごとそのオルガネラへと移行させることに成功している。そこで本研究では、この P(DMAPS-ran-PEGMA)の細胞スフェロイドへの適用の可能性を検討するため、ポリマーのスフェロイド内部への移行挙動を解析した。

【実験】

P(DMAPS-ran-PEGMA)は可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により調製した分子量 (M_n) 17,000 のポリマーを用い、その末端にフルオレセインあるいは抗がん剤のドキソルビシンを修飾した。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を、 5×10^3 cells/well で細胞低接着処理した 96 ウェルディッシュに播種し、10%FBS を含む DMEM 培地で 96 時間培養することで調製したスフェロイドに P(DMAPS-ran-PEGMA)を終濃度 0.1 mg/mL で添加し、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

【結果と考察】

単層培養した HepG2 細胞への細胞内移行は、フルオレセイン修飾した P(DMAPS-ran-PEGMA)では細胞全体へと迅速に移行する。また、ドキソルビシンを修飾した P(DMAPS-ran-PEGMA)は、細胞内への移行速度はやや低下するものの、細胞内へと移行して核およびミトコンドリアへと移行する。フルオレセイン修飾ポリマーをスフェロイドへと添加した場合、添加と同時にスフェロイド表層の細胞内への移行が観察されはじめ、内部へと伝播するように移行し、1時間後にはおよそ 300 μm の直径を有するスフェロイドの最深部からポリマー由来の蛍光が観察された。この際、ポリマーはスフェロイド中の細胞の位置を問わず、単層培養と同じく細胞全体にほぼ均一に分布していた。また、単層培養では膜透過し核へと主に移行するドキソルビシンをスフェロイドへ添加すると、スフェロイドの表層部に位置する細胞の核への局在が認められたが、スフェロイド深部への移行は認められなかった。その一方でドキソルビシンを修飾した P(DMAPS-ran-PEGMA)は、およそ2時間を要し最深部へ到達した。このときポリマーは細胞核へは移行せず、ミトコンドリアや細胞質と考えられる部位への局在が観察された。この挙動は HepG2 細胞の単層培養とは異なるものであり、今後より詳細に検討を行っていく。

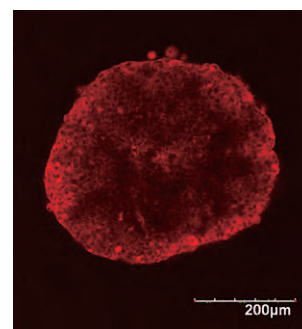


図 1 ドキソルビシン修飾 P(DMAPS-ran-PEGMA)の細胞スフェロイド内分布

【謝辞】 本研究の一部は、科学研究費補助金(17H02096)の助成を受けて行った。

Translocation of Sulfobetaine Polymers into HepG2 Spheroid Cells

Nobuyuki Morimoto, Yoshifumi Oishi, Masaya Yamamoto

Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University

Tel: +81-22-795-7365, Fax: +81-22-795-7313, E-mail: morimoto@material.tohoku.ac.jp

放射線治療のための金ナノ粒子内包分子インプリントポリマーナノゲルの開発

神戸大院工¹・神戸大院医²・東大院医³

○北山 雄己哉¹・山田 託也¹・木口 健太郎¹・吉田 碧衣¹・赤坂 浩亮²・西村 勇哉¹・五十嵐 一紀³・松本 有³・佐々木 良平²・竹内 俊文¹

【緒言】

放射線療法は、通院で低侵襲のがん治療を行え、患者に対して低負担であることから、がん治療において広く使用される。しかし、腫瘍組織のみに放射線照射を行うことが難しく、周辺の正常組織が損傷する危険性があるため、低放射線量での治療が望まれる。そのため低線量における放射線治療を実現できる放射線増感剤が注目され、特に高い生体適合性および低い細胞害性を有する金ナノ粒子が研究されている。しかし、金ナノ粒子を生体に直接投与した場合、生体防御網にトラップされることで血中から速やかに消失し、腫瘍蓄積性が著しく低下してしまい効果的な放射線治療を実現できないという課題が存在する。そのような中、当研究室では、非オプソニンタンパク質を血液中で認識し、ナノ粒子表面に形成されるプロテインコロナ層を制御することで、血中その場でステルス性を後天的に獲得する新たなナノキャリア（分子インプリントポリマーナノゲル：MIP-NGs）創製技術を開発し、腫瘍組織に対して受動的ターゲティング能を示すことも明らかにした。¹⁾

本研究では、ステルスナノキャリアである MIP-NGs に、放射線増感剤である金ナノ粒子を内包することで、新たな高血中滞留性放射線増感剤（金ナノ粒子内包分子インプリントポリマーナノゲル：Au MIP-NGs）を開発し、マウスを用いた血中滞留性試験および担癌マウスを用いた放射線治療効果を検討した。

【実験】

Human serum albumin (HSA)とそれに対して相互作用可能な機能性モノマー-pyrrolidyl acrylate を 10 mM PBS (pH 7.4)中にて混合し、*N*-isopropyl acrylamide、*N,N'*-methylenebisacrylamide、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine、*N,N'*-bis(acryloyl)cystamine、methacryloyloxyethyl thiocarbonyl rhodamine B、V-50 を添加し、70°Cで 12 時間無乳化剤沈殿重合を行った。重合後、サイズ排除クロマトグラフィにより、鑄型 HSA および残存モノマーの除去を行い MIP-NGs を得た。*N,N'*-bis(acryloyl)cystamine 由来のジスルフィド結合を還元し、得られたチオール化 MIP-NGs 分散液に H₂SO₄・3H₂O を加え、NaBH₄ で還元することで、Au MIP-NGs を作製した。Miyapaka2 を担持したヌードマウスを作製し、尾静脈より Au MIP-NGs を投与し、放射線照射を行った後に、腫瘍サイズを測定することで放射線治療効果を確認した。

【結果と考察】

得られた Au MIP-NGs の粒子径は平均約 95 nm であり、ナノメートルサイズの Au MIP-NGs が得られた。金ナノ粒子生成後、局在表面プラズモン共鳴に由来する極大吸収が観察され、内包された金ナノ粒子量を ICP 発光分光分析によって測定したところ、4.96 wt%であることがわかった。さらに担がんマウスに対して Au MIP-NGs を投与し、放射線治療を施したところ、コントロールである PBS を投与した群に比べて有意に腫瘍サイズが小さくなっており、放射線増感効果を確認できた。以上のことから、放射線治療における新規高血中滞留性放射線増感剤として Au MIP-NGs を創製することに成功した。

Molecularly Imprinted Nanogels Incorporating Gold-Nanoparticles as Radiation Sensitizer

Yukiya KITAYAMA¹, Takuya YAMADA¹, Kentaro KIGUCHI¹, Aoi YOSHIDA¹, Hiroaki AKASAKA², Yuya Nishimura¹, Kazunori IGARASHI², Yu MATSUMOTO³, Ryohei SASAKI², Toshifumi TAKEUCHI¹ (¹ Graduate School of Engineering, Kobe University, ² Graduate School of Medicine, Kobe University, ³ Graduate School of Medicine, The University of Tokyo) Tel: +78-803-6158, Fax: +78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

両親媒性液晶高分子を用いた刺激応答性自己集合体の設計と薬物キャリアへの応用

¹ 関西大学化学生命工学部, ² 関西大学 ORDIST

○平野 雄基¹, 井上 泰彰¹, 河村 暁文^{1,2}, 宮田 隆志^{1,2}

【緒言】ドラッグデリバリーシステム (DDS) に用いられる薬物キャリアの 1 つに両親媒性高分子から形成される自己集合体が挙げられる。しかし、この自己集合体は外部刺激に反応して崩壊するため、内包物の徐放が困難である。そこでわれわれは、刺激応答時に崩壊せず、薬物徐放を可能とする自己集合体を設計するために液晶高分子 (LCP) に着目した。LCP は液晶発現分子である剛直なメソゲンを有し、液晶—等方相転移温度 (T_i) を介してメソゲンの配向性が高い液晶相から配向性が低い等方相に相転移する。なかでもポリメチルシロキサン (PMS) などの柔軟な主鎖を用いた側鎖型 LCP は、メソゲンの配向性が主鎖の柔軟性に依存するため、主鎖型 LCP と比較して低温に T_i を示す。また、メソゲン導入率を調節することにより、 T_i を体温付近に調節することも可能である。本研究では、徐放能を有する刺激応答性薬物キャリアの創製を目的として、主鎖の PMS に側鎖として疎水性のメソゲンと親水性のポリエチレングリコールメタクリレート (PEGMA) とを導入した両親媒性液晶高分子 (LCP-g-PEG) を合成し、その自己集合体を調製した。さらに、自己集合体にモデル薬物を内包させ、温度変化に伴う薬物放出挙動やさまざまな細胞への取り込み挙動について検討した。

【実験】ヒドロシリル化反応により、LCP-g-PEG を合成した。合成した LCP-g-PEG の T_i は示差走査熱量計 (DSC) 測定により決定した。次に、フルオレセイン (Flu) と LCP-g-PEG をジメチルスルホキシドに溶解させ、超純水に対して透析することにより、Flu 内包 LCP-g-PEG 自己集合体を調製した。また、さまざまな細胞への LCP-g-PEG 自己集合体の取り込み挙動を検討した。

【結果・考察】DSC 測定より、LCP-g-PEG の T_i は 36.2 °C と決定された。また、LCP-g-PEG 自己集合体の粒径を動的光散乱法により測定したところ、134 nm であることがわかった。Fig. 2 には、温度変化に伴う自己集合体からの Flu 放出挙動を示した。図より、 T_i 以下の 25 °C では Flu の放出が効果的に抑制されているが、 T_i 以上の 50 °C では明確に Flu の放出量が増加していることがわかる。 T_i 以下ではメソゲンが規則的に配向しているため、Flu の放出が抑制される。しかし、 T_i 以上になると液晶相から等方相へ相転移し、メソゲンが不規則な構造を形成するため、Flu の放出が促進されたと考えられる。Fig. 3 には、自己集合体をヒト肝癌由来細胞 (HepG2) に接触させた際の蛍光顕微鏡画像を示した。図より、自己集合体が HepG2 内に取り込まれていることがわかる。一般に、表面に PEG を有する薬物キャリアは細胞への取り込みが抑制されることが知られている。正常細胞と比較して、がん細胞は取り込み能が高いため、自己集合体を取り込まれたと考えられる。

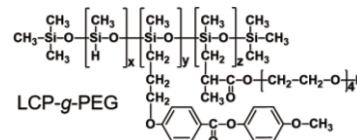


Fig. 1. Structure of LCP-g-PEG.

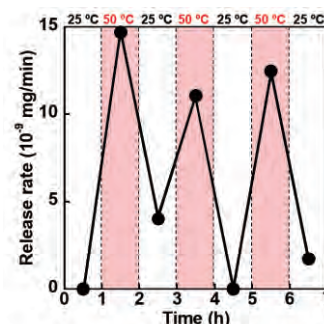


Fig. 2. Fluorescein release profile from Flu-loaded LCP-g-PEG assemblies in response to stepwise changes in temperature between 25 and 50 °C.

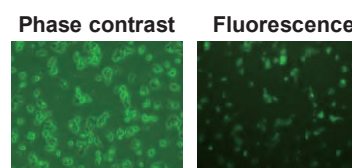


Fig. 3. Phase and fluorescence images of the HepG2 cells incubated with fluorescein-loaded self-assemblies at 30 °C for 12 h. The LCP-g-PEG self-assemblies concentration was 0.09 mg/mL.

Design of Stimuli-responsive Self-assemblies Composed of Amphiphilic Liquid Crystalline Polymers and Their Applications as Drug Carriers

Yuki Hirano¹, Yasuaki Inoue¹, 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: +81-6-6368-0949, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: tmiyata@kansai-u.ac.jp

リポソーム内包温度応答型生分解性インジェクタブルゲルによる水溶性薬物徐放システム

関西大化学生命工¹・関西大 ORDIST²・関西大医工薬研セ³
 ○山本洋輝¹・能崎優太²・葛谷明紀^{1,3}・大矢裕一^{1,3}

【緒言】 室温ではゾル状態で、生体内に注入すると体温に反応してヒドロゲルを形成する温度応答型生分解性インジェクタブルポリマー (IP) は、薬物徐放デバイスや癒着防止材などへの応用が期待されている。我々は、生分解性 IP の中でも、乾燥状態で粉末性状を示すカプロラクトン-グリコール酸共重合体 (PCGA) とポリエチレングリコール (PEG) からなる共重合体 (PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA, tri-PCG)¹⁾ の薬物徐放システムへの応用を試みている²⁾。一般に、低分子量の水溶性薬物はゲルの網目サイズに比べて非常に小さいため、薬物を直接 IP ゲルに封入しただけでは長期にわたる薬物徐放の達成は困難である。そこで本研究では、水溶性薬物の見掛けの分子サイズを大きくするためリポソームに封入し、IP 溶液と混合した後にゲル化させることで IP ゲルからの徐放を試みた (Fig. 1)。

【実験、結果および考察】 卵黄ホスファチジルコリンの脂質薄膜を蛍光物質ピラニン(モデル薬物)と消光剤 DPX を含む PBS 溶液に分散した後、孔径 100 nm のフィルターに通して粒径を調整し、遠心分離で未内包の蛍光物質を除去することでピラニン封入リポソームを得た。次に、ピラニン封入リポソーム分散液と tri-PCG の PBS 溶液を混合して加熱して作成したゲル上部に PBS を加え、37 °C で所定時間インキュベートして上澄みに放出された蛍光を測定し、ピラニンを直接 IP ゲルに内包した場合と比較することで放出挙動を評価した。その結果、ピラニンを直接内包した IP ゲルはリリースが 3 日後に 100 % に達したのに対し、ピラニン封入リポソームを内包した IP ゲルは 3 日後でも約 8 % であった。このことから、リポソームに封入することにより、IP ゲルからのピラニンの拡散を抑制できることが示された。次に、これらの IP 溶液を、マウス背部皮下に投与した際の投与部位での蛍光と、血中の蛍光物質濃度を追跡した。その結果、ピラニン封入リポソームを内包した IP ゲルは、投与 24 h 後も投与部位でピラニンの蛍光が観測されたが、ピラニンを直接内包した IP ゲルでは蛍光が消失した (Fig. 2)。これにより、薬物封入リポソームと IP を複合化することで、投与部位に薬物を留め徐放できることが示唆された。また、採取した血液を用いて蛍光測定を行った結果、ピラニンを直接内包した IP ゲルでは、9 日後には検出限界を下回ったのに対し、ピラニン封入リポソームを内包した IP ゲルでは 30 日後においても有意な蛍光を観測することが可能であった。これらの結果より、低分子量水溶性薬物をリポソームに封入し、IP ゲルに内包することで、長期に渡る薬物徐放が達成できることが示唆された。

1) Y. Yoshida, A. Takahashi, A. Kuzuya, Y. Ohya, *Polym. J.*, **2014**, *46*, 632-635.

2) K. Takata, Y. Ohya, et al., *Gels.*, **2017**, *3*, 38, doi: 10.3390/gels3040038.

Sustained releasing system of water-soluble drugs using temperature-responsive biodegradable injectable hydrogel entrapping liposomes

Hiroki YAMAMOTO¹, Yuta YOSHIZAKI², Akinori KUZUYA^{1,3}, Yuichi OHYA^{1,3} (¹Faculty of Chem., Mater. & Bioeng., ²ORDIST, ³CEMP, Kansai University, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan)

Tel: 06-6368-0818, Fax: 06-6339-4026, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp, k250994@kansai-u.ac.jp

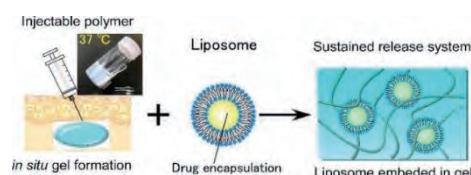


Fig. 1. Design of sustained release system using liposome embedded in IP gel.

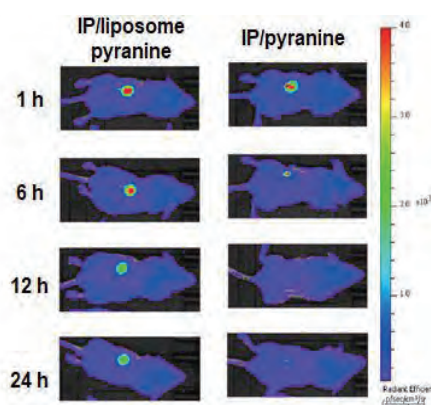


Fig. 2. Fluorescence images of mice received s.c. injection of IP formulation analysed by IVIS.

エクソソーム-磁場応答性ナノゲル複合体による細胞機能制御

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻

○水田 涼介, 河崎 陸, 澤田 晋一, 佐々木 善浩, 秋吉 一成

【緒言】多くの細胞は、脂質二重膜からなる各種の細胞外ベシクルを分泌していることが知られている。特に、エクソソームは、比較的遠距離での細胞間の情報伝達などに関与していることがわかってきた。また近年、エクソソームに内包された核酸やタンパク質により幹細胞を種々の細胞に分化誘導可能であることが報告されており、再生医療をはじめとした先端医療の分野への応用が期待されている。しかし、細胞への導入効率が低いことから、エクソソームの効率的な送達技術の開発が求められている。

我々は、これまで疎水化多糖からなる物理架橋型の多糖ナノゲルと酸化鉄ナノ粒子のハイブリッドである磁場応答性ナノゲル（磁性ナノゲル）がタンパク質 DDS に有用であることを報告してきた^[1]。また、磁性ナノゲルは、エクソソームと安定な複合体を形成することを明らかにしてきた。このような背景のもと、本研究ではエクソソーム-磁性ナノゲル複合体によるエクソソームの細胞内導入、およびエクソソームのデリバリーによる幹細胞の分化誘導について検討した結果について報告する。

【実験】コレステリル基置換プルラン（CHP）からなるナノゲルに対して、有機溶媒中に分散させたオレイン酸被覆酸化鉄ナノ粒子を混合することにより、磁性ナノゲルを調製した。筋芽細胞、神経細胞の培養上清から超遠心法によって、エクソソームを単離し、このエクソソームと磁性ナノゲルを混合することによって、磁性ナノゲル-エクソソーム複合体を作製した。磁場による複合体の分離操作により、遊離のエクソソームを分離・定量し、エクソソームと磁性ナノゲルの複合化率を求めた。得られた磁性ナノゲル-エクソソーム複合体を磁気誘導により細胞へと送達し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらに、その細胞内導入効率について、フローサイトメトリーを用いて、定量的に評価した。複合体を磁気誘導により脂肪由来間葉系幹細胞（ADSC）へと導入した後、各種の分化マーカーを免疫染色により検出することによって、複合体による筋芽細胞および神経細胞への分化誘導能を確認した。

【結果と考察】エクソソーム-磁性ナノゲル複合体の複合化挙動を経時的に評価したところ、24 時間で 90%のエクソソームが磁性ナノゲルと複合化できることが明らかとなった。得られた複合体を磁気誘導により ADSC へと送達し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、複合体を添加し、磁場を印加した系においてのみ、細胞質への磁性ナノゲルとエクソソーム導入が確認された。フローサイトメトリーの結果からも同様の挙動が見られた。また、免疫染色の結果から磁気誘導により、複合体を ADSC へと導入した系において、最も強く分化マーカーの発現が確認された。効率的なエクソソームの送達によって、ADSC に対して、分化が誘導された。この磁性ナノゲル導入法は、エクソソーム機能の微量解析手法やエクソソームを用いた新規細胞機能制御技術として再生医療への利用が期待される。

【参考文献】 [1] R. Kawasaki, Y. Sasaki, K. Katagiri, S. Mukai, S. Sawada, K. Akiyoshi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*,55,11377-11381(2016)

Preparation of exosome-magnetoresponse nanogel hybrid for control of cellular functions

Ryosuke Mizuta, Riku Kawasaki, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi

Graduate School of Engineering, Kyoto University

Tel: +81-75-383-2823, E-mail: mizuta.ryosuke.62w@st.kyoto-u.ac.jp

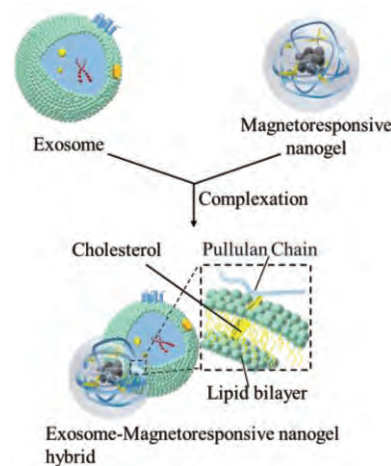


Figure.1 Preparation of Exosome-Magnetoresponse nanogel hybrid

siRNA を膜成分として含有するベシクル型ポリイオンコンプレックス (siRNAsome)の構築と siRNA デリバリーへの展開

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, ³ 九州大学大学院工学研究院,
⁴ 川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター

○宮田 完二郎¹, キム ボブス¹, チュアノイ サヤン¹, 須磨 知也¹, 安楽 泰孝¹, 内藤瑞², キム ヒョンジン², 岸村 顕広³, 片岡 一則⁴

【緒言】ポリカチオンとポリアニオン間で形成される多分子会合体ポリイオンコンプレックス (PIC) は、ポリカチオン/ポリアニオンの構造や鎖長に応じて多様な形態を取り得ることから、基礎研究から応用研究にかけて広く注目されている。中でも興味深いのは、ポリエチレングリコール (PEG) とポリカチオン/ポリアニオンのブロック共重合体を用いて PIC を調製すると、PEG の重量分率に応じてミセル型 PIC とベシクル型 PIC の創り分けができる点である。本研究では、近年核酸医薬として注目を集めている small interfering RNA (siRNA) に着目し、PEG-ポリカチオンブロック共重合体との間でベシクル型 PIC (siRNAsome) の構築を試みた (Fig. 1)。ベシクル型 PIC の膜上に siRNA を搭載することで、1 粒子当たり非常に多くの siRNA を搭載することが可能になる。また、内水相には異なる水溶性高分子を内包できることから、siRNA と機能性高分子の同時デリバリーも可能になる。従って、siRNAsome の構築および構造解析に取り組むと共に、siRNA デリバリーシステムとしての可能性を評価した。

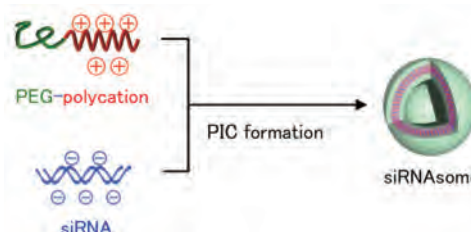


Fig. 1. Schematic illustration of siRNAsome formation.

【実験】siRNAsome を構築するために、分子量 2,000 の PEG、重合度 70 のカチオン性ポリアスパルタミド誘導体を合成した。合成の確認は ¹H NMR により行った。PEG-ポリカチオンと siRNA をそれぞれ緩衝液中に溶解し、所定の比率で攪拌混合することで siRNAsome を調製した。siRNAsome の形成については、動的光散乱 (DLS)、電気泳動光散乱 (ELS)、および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により検証した。次いで、生理環境下で安定な siRNAsome を得るために、グルタルアルデヒド (GA) によるベシクル膜の架橋を行った。siRNAsome の安定性に関しては、生理塩濃度下で静置した後の粒径変化から評価した。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常発現する肝臓がん (Huh-7/Luc) 細胞を培養し、ルシフェラーゼに対する siRNA (siLuc) を搭載した siRNAsome を添加することで、遺伝子発現抑制 (RNAi) 効果を評価した。

【結果と考察】DLS と ELS の結果より、調製した PIC の粒径 (多分散度) とゼータ電位はそれぞれ 104 nm (0.1) と 17.8 mV と求まり、粒子径分布の狭いナノ粒子の形成が確認された。さらに、TEM 像において、直径約 100 nm の中空状粒子が観察されたことから、siRNAsome が構築されたことが示唆された。非架橋の siRNAsome を生理塩濃度下で静置したところ凝集体を形成してしまったが、GA 架橋後は凝集体形成を抑制できることが確認された。この架橋 siRNAsome に siLuc を搭載し、培養 Huh-7/Luc 細胞に添加したところ、Luc に対する有意な RNAi 効果を誘導した。非架橋の siRNAsome は有意な RNAi 効果を示さなかったことから、GA 架橋による安定化が siRNAsome のデリバリー機能に重要であることが示された。

Development of Vesicular Polyion Complexes from siRNAs and PEGylated Block Cationers (siRNAsomes) for siRNA Delivery

Kanjiro MIYATA¹, Beob Soo KIM¹, Sayan CHUANOI¹, Tomoya SUMA¹, Yasutaka ANRAKU¹, Mitsuru NAITO², Hyun Jin KIM², Akihiro KISHIMURA³, Kazunori KATAOKA⁴

¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, ²Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, ³Graduate School of Engineering, Kyushu University, ⁴Innovation Center of NanoMedicine (iCONM), Kawasaki Institute of Industrial Promotion

Tel: +81-3-5841-0862, Fax: +81-3-5841-7139, E-mail: miyata@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

ナノ粒子操作による膜モルフォジェネシスの制御と機能評価

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻

○井上 文仁, 佐々木 善浩, 澤田 晋一, 秋吉 一成

【緒言】 生体内では、脂質膜の構造が動的に変化することで様々な機能が制御されている。例えば、細胞が分泌するエクソソームをはじめとする細胞外ベシクルは、がんの転移など比較的遠距離での情報伝達に関与していることが最近明らかになっている。また、細胞膜をチューブ状に伸長する神経細胞や、細胞間で直接物質輸送を行うトンネリングナノチューブなども脂質膜の構造が動的に変化することで生体機能を発現している例として挙げられる。

我々はこれまでに、せん断流や電場などの外部場により膜構造を変化させることで、非常にアスペクト比の大きい脂質ナノチューブを作製できることを明らかにしてきた。本研究では遠心力によるナノ微粒子の運動を利用することで、脂質膜構造を変化させ、脂質膜被覆ナノ微粒子などの脂質膜基盤ナノ材料の創出をおこなった。

【実験】 アガロースゲル(1.0 wt%)により、多孔質基板(空孔径 5.0 μm , 開口密度 6.0×10^5 pores/cm², 面積 4.5 cm²)を被覆した。

静置水和法により蛍光標識した脂質を含むリン脂質(DOPC)からなるリポソーム分散液をこのゲル上に添加した。この多孔質基板に遠心操作を行い、溶媒を多孔性基板の下層に落下させることで脂質膜をゲル上部に固定化した。続いて、作製した脂質膜固定化ゲル基板に蛍光修飾シリカ微粒子分散液(100 nm)を添加し遠心操作を行った。操作後の微粒子溶液を分取し、蛍光スペクトル測定による蛍光脂質、微粒子の定量、及び動的光散乱測定、ナノ粒子トラッキング解析を用いて粒径測定を行った。

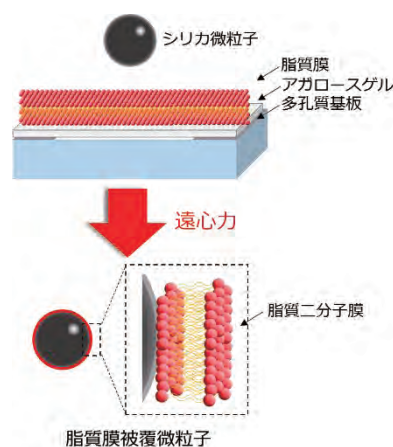


Fig 1. 脂質二分子膜被覆微粒子の作製法

【結果と考察】 蛍光スペクトル測定を行ったところ、微粒子由来の蛍光物質とともに脂質膜由来の蛍光物質の存在が確認された。この結果から、シリカ微粒子が脂質膜を透過することで、微粒子表面は脂質膜で被覆されていることを示している。このシリカ微粒子について、動的光散乱測定、ナノ粒子トラッキング解析を行ったところ、元のシリカ微粒子と比較し、その粒径が 15~20 nm 程度増大していたことから、脂質二分子膜を被覆した脂質膜被覆シリカナノ微粒子が得られていることが示された。本手法は、微粒子表面に脂質膜を極めて簡便にコーティングし、生体適合性を付与する従来全く例のない手法として極めて興味深い。現在、収率の向上や本手法の一般性の確立などを目的として、アガロースゲル以外のナノ細孔基板に固定化した脂質膜から脂質膜被覆微粒子の作製を試みた結果についても併せて報告する。

Control and function of membrane morphogenesis by manipulation of nanoparticles.

Fumihito Inoue¹, Yoshihiro Sasaki¹, Shin-ichi Sawada¹, Kazunari Akiyoshi¹ (¹Graduate School of Engineering Kyoto University, Kyoto university, Kyotodaigaku-katsura, Nishikyo-ku, Kyoto, 615-8510, Japan)

Tel: +81-075-383-2589, Fax: +81-075-383-2590, E-mail: inoue.fumihito.87w@st.kyoto-u.ac.jp

In vivo 持続的遺伝子発現を実現する pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの分子設計

¹ 首都大学東京 大学院 都市環境科学研究科 環境応用化学域, ² 東京薬科大学 薬学部
○朝山 章一郎¹, 種市 さくら¹, 川上 浩良¹, 根岸 洋一²

【緒言】 *In vivo* デリバリーにおける plasmid DNA (pDNA) 複合体の構造的課題点を克服するために、我々はポリエチレングリコール (PEG) の分子末端にアルキルイミダゾリウムを導入したアルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG を合成し、pDNA とのモノイオンコンプレックス (MIC) 形成を実現した [1]。また、アルキルイミダゾリウムのアルキル鎖末端に第一級アミドを導入し、アデニンとの水素結合形成により MIC 形成能を向上させた ω -アミド-ペンチルイミダゾリウム末端修飾 PEG (APe-Im-PEG) は、*in vivo* 脛骨筋局所投与による遺伝子発現の向上を達成してきた [2, 3]。

本研究では、生体個体内に滞留している MIC の持続的遺伝子発現を目指し、PEG ジレンマ解消、および、MIC の細胞内取込後のエンドソーム脱出の観点から、PEG 切断後に pDNA 結合部側にカルボキシル基が露出するモノカチオン性 PEG (APe-Im-E-PEG) を分子設計した (Figure 1)。得られた APe-Im-E-PEG/pDNA MIC の *in vivo* 持続的遺伝子発現を評価したので報告する。

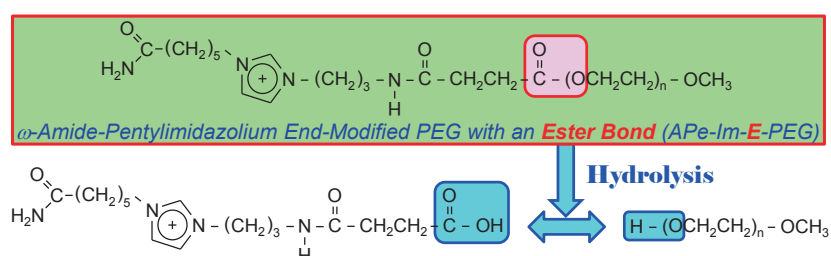


Figure 1. Design of a ω -amide-pentylimidazolium end-modified PEG with an ester bond (APe-Im-E-PEG).

【実験】

MIC は pDNA と APe-Im-E-PEG を水中で混合して 37°C で 24 時間インキュベートして調製した。得られた APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC をマウス脛骨筋投与後、ルシフェラーゼレポーターアッセイで遺伝子発現を評価した。この時、コントロールとして、エステル結合を有さないモノカチオン性 PEG (APe-Im-PEG)、および、エステル結合を有しても pDNA 結合部側に pH 非応答性ヒドロキシル基が残るモノカチオン性 PEG (APe-Im-e-PEG) を用いて実験を行った。

【結果と考察】

電荷比 (+/-) が 1 で調製したエステル結合を有する APe-Im-E-PEG/pDNA MIC は、エステル結合を有さない APe-Im-PEG/pDNA MIC と比較して、脛骨筋投与後、1 週間後から 2 週間後にかけて、大幅な遺伝子発現の向上が見られた (results not shown)。一方、エステル基を有していても結合の向きが異なる APe-Im-e-PEG/pDNA MIC では、経時的な遺伝子発現の向上は認められなかった。

これらの結果は、エステル加水分解により、PEG ジレンマの解消に基づく細胞内取り込みの向上、および、生じたカルボキシル基の pH 応答性に基づく細胞質内移行の促進を示唆している。

【謝辞】 本研究は科学研究費補助金基盤研究 (B) (16H03183) により実施された。

【参考文献】 [1] S. Asayama et al., *Biomacromolecules*, 15, 997-1001 (2014). [2] S. Asayama et al., *Biomacromolecules*, 16, 1226-1231 (2015). [3] 朝山章一郎他, 特許第 6358661 号。

Design of the Mono-Ion Complex for In Vivo Sustainable Gene Expression

Shoichiro Asayama¹, Sakura Taneichi¹, Hiroyoshi Kawakami¹, Yoichi Negishi²

¹Department of Applied Chemistry, Tokyo Metropolitan University

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

Tel: +81-42-677-1111 (Ext.) 4976, Fax: +81-42-677-2821, E-mail: asayama-shoichiro@tmu.ac.jp

超音波をトリガーとした薬剤放出システムに関する基礎的検討

¹千葉大学フロンティア医工学センター, ²大学院総合文化研究科 広域科学専攻関連基礎科学系
○中田 大貴¹, 豊田 太郎², 吉田憲司¹, 林秀樹¹

【緒言】われわれはこれまで、リン脂質を用いて作製した近赤外蛍光リポソームを食用の増粘剤を用いてベシクル凝集体 (GCV) とすることにより、これが腹腔鏡手術ナビゲーションにおける組織マーカーとして利用可能であることを示して来た。リポソームはその粒径を調整することにより効率的にリンパ系に取り込まれることから、もし組織マーカーとして投与した GCV を必要に応じて生体内で破壊しリポソームを放出することができれば、腹腔鏡手術などにおいて腫瘍位置のナビゲーションに利用できるばかりではなく、郭清すべきリンパ節の分布を明らかにすることも可能であると考えられる。そこで、われわれは超音波照射により GCV を破壊し、内包されたリポソームを放出可能な新しい薬物送達システムの着想を得た。これを実現するため、まず蛍光性量子ドット(Quantum Dots : QD)が GCV の内包内容放出の検出に使用可能であるかどうかに関して検討を行った。

【方法】ベシクル凝集体を作製するために油相、内相、外相を作製した。油相は PGPR とスクアレンを混合して 40℃の恒温槽に静置したものであり、内相は 1 mol/L のスクロース溶液に 0.05mg/ml の濃度で分散させた QD 分散液で、外相は 1mol/L のグルコース溶液である。最初に油相液 3.5 ml に内相液 0.5 ml を混合させ、この混合液を外相液 7 ml の上に重ねた。この液を遠心機で 3500 rpm で 30 分間遠心沈降を行った。遠心後、上から液を吸い取り、下から 1.5 ml の液体を残し、この液体をベシクル凝集体の分散液とした。この分散液を光学顕微鏡と蛍光顕微鏡で観察を行い、光学顕微鏡でベシクル凝集体の状態を確認し、蛍光顕微鏡でベシクル凝集体内の蛍光が観察できるのかを確認した。

【結果と考察】QD を内包したものと内包していないベシクル凝集体をそれぞれ作製したものを光学顕微鏡と蛍光顕微鏡で観察を行い比較した。光学顕微鏡観察では QD の内包、未内包に関わらず、ベシクル凝集体は問題なく作製されていた。蛍光顕微鏡の青色光観察時では、QD 未内包のベシクル凝集体は確認しづらいが、QD を内包したベシクル凝集体は中が光って見えているため確認しやすく、ベシクル凝集体に QD が内包できていることが確認できた。画像処理から輝度値を計測した結果でも、QD 内包と未内包での違いは明らかであった。今後、このベシクル凝集体に超音波を照射し、内包されている QD の挙動を検討することが必要である。

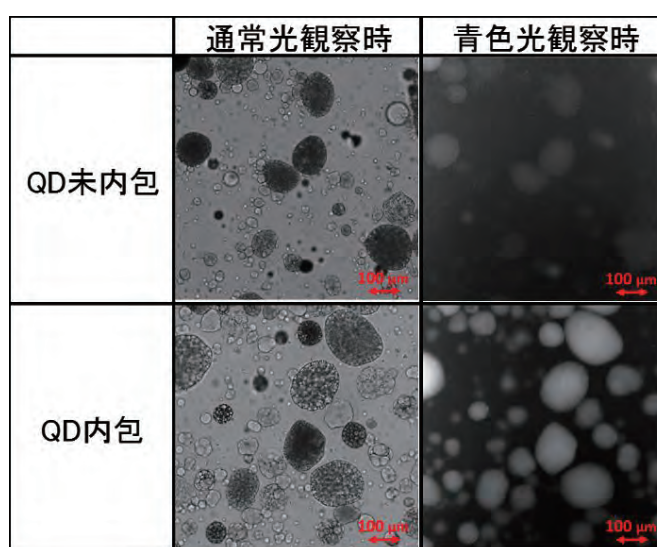


図 蛍光顕微鏡観察の比較

Fundamental study on new drug release system triggered by ultrasound

Taiki Nakada¹, Taro Toyota², Kenji Yoshida¹, Hideki Hayashi¹

¹Center for Frontier Medical Engineering, Chiba University

²Graduate School of Arts and Science, Tokyo University

Tel:+81-043-290-3114, FAX:+81-043-290-3403, E-mail:aeua2274@chiba-u.jp

