第40回

日本バイオマテリアル学会大会

予　稿　集

JSB

■２０１８年１１月１２日～１３日

■ 神戸国際会議場

大会長　山岡哲二

本会に無断で複製・転載することを禁ず

第４０回日本バイオマテリアル学会大会

予稿集

テーマ　バイオマテリアル研究・新たな時代へ

会 期　2018 年11 月12 日（月）～13 日（火）

会 場　神戸国際会議場

大会長　山岡 哲二
国立循環器病研究センター研究所

第４０回日本バイオマテリアル学会大会

「バイオマテリアル研究・新たな時代へ」

大 会 長 挨 拶



バイオマテリアル(生体材料)は、生体に直接接触させて使用する材料を意味し、医療・福祉・公衆衛生に資する機器やシステムの開発を目的としています。1990 年代中後半、金属、セラミックス、合成高分子、生体由来物質を材料とした縫合糸、人工血管、人工関節、眼内レンズ、補助人工心臓、人工透析、冠動脈ステントなどの医療機器が次々と開発されました。そのような時代に、バイオマテリアルの研究・教育・産業化に関する情報交換を通して新学問領域としての体系化と確立および臨床応用を計るために 1978 年に本学会は設立されました。設立 40 周年を迎え、会員数 1300 人を超える世界で最も大きなバイオマテリアル関連学会となりましたのも、ひとえに、会員の皆様方のご支援のたまものと感謝しております。この間、さまざまな医療機器の実用化だけでなく、分子生物学の進歩、高精度な解析装置の発展、新たな低侵襲イメージング技術の実用化、iPS や MSC など幹細胞工学の創出など、まさに激動の時代でした。さらに、2014 年に再生医療新法が施行され、2015 年には日本医療研究開発機構（AMED）が設立されることで先端技術の実用化への動きが加速しています。このような大きな環境の変化は、抗体医薬や核酸医薬などの実用化をもたらし、バイオマテリアル研究においても、近年、このようなアプローチとの融合による新奇なデバイス創出が始まろうとしています。

日本バイオマテリアル学会は、この新たな潮流に対応し、さらには世界のバイオマテリアル研究をリードすべく様々な取り組みを始めています。独創的で尖った基礎研究と、安全安心な医療のための実用化研究を学会の両輪として推し進めるために、Ⅰ:基礎マテリアル、Ⅱ:マテリアル機能、Ⅲ:非臨床 POC、Ⅳ:産業化・標準化、のステージカテゴリーを設けてプログラムは組まれています。基礎研究者が多く集う当学会が必ずしも得意とは言えない第Ⅲカテゴリーと第Ⅳカテゴリーを、主に B 会場に集約しました。上述の両輪を真に具備した新しいバイオマテリアル学会を目指して、バイオマテリアルの新たな時代を議論できる場となれば幸いです。

平成30年11月12日

第40回日本バイオマテリアル学会大会
学会設立40周年記念大会
大会長　山岡　哲二
国立循環器病研究センター研究所
生体医工学部・部長

歴代学会大会の系譜（大会長名）

第1 回 (1979) 仙 台 横堀武夫

第2 回 (1980) 東 京 三浦維四

第3 回 (1981) 京 都 中島章夫

第4 回 (1982) 東 京 伊丹康人

第5 回 (1983) 大 阪 川原春幸

第6 回 (1984) 東 京 笹田 直

第7 回 (1985) 名古屋 榊原欣作

第8 回 (1986) 東 京 桜井靖久

第9 回 (1987) 東 京 中林宣男

第10 回(1988) 京 都

3rd WBC 鶴田禎二

10 周年記念大会 東 京 桜井靖久

第11 回(1989) 京 都 山室隆夫

第12 回(1990) つくば 立石哲也

第13 回(1991) 京 都 筏 義人

シンポジウム'92 東 京 浜中人士

第15 回(1993) 神 戸 山中昭夫

第16 回(1994) 山 梨 赤松功也

第17 回(1995) 東 京 中村晃忠

シンポジウム'96 東 京 大井淑雄

第 19 回(1997) 大 阪 中村正明

第20 回(1998) 千 葉 中林宣男

第21 回(1999) 京 都 岡 正典

シンポジウム'00 横 浜 川口春馬

第23 回(2001) 京 都 小久保正

第24 回(2002) 東 京 赤池敏宏

第25 回(2003) 大 阪 大串 始

シンポジウム'04 つくば 田中順三

第27 回(2005) 京 都 堤 定美

第28 回(2006) 東 京 岡野光夫

第29 回(2007) 大 阪 明石 満

シンポジウム'08 東 京 片岡一則

第31 回(2009) 京 都 岩田博夫

第32 回(2010) 広 島 岡崎正之

第33 回(2011) 京 都 中村孝志

シンポジウム'12 仙 台 新家光雄

第35 回(2013) 東 京 前田瑞夫

第36 回(2014) 東 京 石原一彦

第37 回(2015) 京 都 田畑泰彦

シンポジウム'16 福 岡 石川邦夫

第 39 回(2017) 東 京 山下仁大

第 40 回(2018) 神 戸 山岡哲二

目 次

大会長挨拶 ---- 1
歴代学会大会の系譜（大会長名） ---- 2
大会開催概要 ---- 4
発表要領 ---- 6
会場までのご案内 ---- 8
会場案内図 ---- 9
協力企業一覧と謝辞 ---- 12
第40 回日本バイオマテリアル学会大会運営体制 ---- 13
日程表 ---- 14

プログラム
口頭発表
第１日：11月12日（月） ---- 16
第２日：11月13日（火） ---- 30
ポスター発表
第１日：11月12日（月） ---- 47
第２日：11月13日（火） ---- 58
日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流 AWARD ---- 69

予稿集
口頭発表
第１日：11月12日（月）
特別講演１ ---- 72
日本バイオマテリアル学会奨励賞　受賞講演 ---- 73
シンポジウム１ ---- 75
学会賞受賞講演 ---- 79
一般講演（口頭発表） ---- 80
第２日：11月13日（火）
シンポジウム２ ---- 156
特別講演２ ---- 160
教育講演 ---- 161
日本学術会議シンポジウム ---- 187
一般講演（口頭発表） ---- 164
ポスター発表
第１日：11 月 12 日（月） ---- 256
第２日：11 月 13 日（火） ---- 372
日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流 AWARD ---- 487

発表者索引（Index to Authors） ---- 492

第 40 回日本バイオマテリアル学会大会開催概要

第 40 回日本バイオマテリアル学会大会
大会長　山 岡 哲 二
（国立循環器病研究センター研究所）

1．テーマ

バイオマテリアル研究・新たな時代へ

2．会 期

2018 年 11 月 12 日（月），13 日（火）

3．会 場

神戸国際会議場
〒650-0046　神戸市中央区港島中町 6-9-1
TEL : 078-302-5200（代）FAX：078-302-6485
URL: https://kobe-cc.jp/ja/visitors/

4．参加登録と参加費

正 会 員：10,000円
学生会員： 5,000円（学生証をご提示ください）
非 会 員：24,000円

大会会場 1 階に参加登録受付を設置いたします。参加申込用紙に必要事項をご記入のうえ，参加費を添えてお申し込みください。参加章（兼領収書）をお渡ししますので，ホルダーに入れて会場内にお進みください。ホルダーは記入台に設置しております。

＊事前参加登録手続きを済ませられた方は，事前に送付された参加章（兼領収書）をホルダーに入れて会場内にお進みください。

＊第39回大会より，大会当日に冊子体で配布をしておりました予稿集は大会ホームページからのダウンロード版となります。ダウンロードは大会開催1週間前（2018年11月5日）より可能となりますので，パソコン・タブレット・スマートフォンから各自でダウンロードを行ってください。

大会ホームページ http://www.kokuhoken.jp/jsb40

5．懇親会

日時：2018年11月12日（月）18：30〜20：30
会場：アリストンホテル神戸　16階　宴会場（バルセロナ）
会費：6,000円

大会会場 1 階総合受付，懇親会会場入口に懇親会参加登録受付を設置いたします。

＊事前参加登録手続きを済ませられた方は，参加章（兼領収書）に懇親会出席シールを貼付しております。参加章をお着けいただき，そのまま会場内にお進みください。

6．企業展示

11 月 12 日（月），13 日（火）の 2 日間，3 階エントランスホール・3 階ラウンジ・3 階レセプションホール・5 階ラウンジにて行います。

7．ランチョンセミナーご案内・参加方法

11月12日（月），13日（火）の両日，B会場，C会場において，ランチョンセミナーが開催されます。ご参加につきましては昼食数に限りがございますので，当日「整理券」を配布いたします。（当日開催されるセミナー分のみ発券）

○　配布場所：国際会議場１F　A会場　メインホール前

○　配布時間：11月12日（月）8:30～11:30，11月13日（火）8:00～11:30

＊　セミナー開始５分後までにご来場されない場合，整理券は無効となります。

8．スタンプラリーのご案内

本大会では多くの企業に展示協力を頂きましたので，スタンプラリーを企画しました。スタンプラリーシートは，ポケットプログラムにあります。展示コーナーで有益な時間をお過ごし頂いた証としてスタンプをもらってください。スタンプが**7個以上**集まったら，回収箱に入れてください。抽選で素敵なプレゼントをさし上げます。

○　シート回収場所：国際会議場１F総合受付横の学会ブースに設置した回収箱。

○　シート回収時間：13日（火）の午後４時まで

○　抽選：13日午後５時からA会場で抽選会を開始し，閉会式でプレゼントをさし上げます。当選者が不在の場合は，勝手ながら当選を無効とさせていただきます。

9．学会入会案内

11月12日（月），13日（火）の２日間，１ 階に「日本バイオマテリアル学会事務局デスク」を設置します。入会をご希望の方は，お申し込みください。

１０．クローク

会期中，地下1 階 リハーサル室にクロークを開設いたします

開設時間： 11月12日（月）8:30 ～ 18:30，　20:00 ～ 21:00，　11月13日（火）8:00 ～ 18:00

１１．休憩室

会期中，大会会場３階ラウンジ・４階 401号室 ・５階ラウンジに参加者用の休憩室を開設いたします。

１２．託児施設

大会会場内には託児施設はございませんが，ポートピアホテル内に一時預かり託児所（チャイルドケアルーム　ファンタジックアリス）がございます。

右記のサイトよりご確認ください。http://www.up-l.co.jp/portopia.html

１３．注意事項

会場内における写真・ビデオ撮影はご遠慮ください。また，動物を対象とした研究では，動物愛護の立場から適切な実験計画を立て全期間を通じて飼育および保管に配慮することが必要です。発表内容や掲載写真につきましても，動物愛護の精神に十分な配慮をお願いします。

１４．運営事務局（問合せ先）

国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部内

第40回日本バイオマテリアル学会大会事務局（担当：馬原　淳，内田由希子）

〒565-8565　大阪府吹田市藤白台5-7-1

TEL : 06-6833-5012 (内2637)　FAX : 06-6835-5476　E-mail : jsb40@ncvc.go.jp

発表要領

【Ⅰ】特別講演，シンポジウム，教育講演，日本学術会議シンポジウム，受賞講演，一般演題（口頭発表）

（1）発表時間

・一般演題の口頭発表は発表11分，質疑応答3分，交代時間1分です。発表終了1分前，発表時間終了時にそれぞれ合図があります。

・特別講演，シンポジウム，教育講演，日本学術会議シンポジウム，受賞講演につきましては，あらかじめ指定しております発表時間と質疑応答時間に従ってください。

・円滑なプログラム進行ができるよう，時間厳守にご協力をお願いいたします。

（2）発表者にてご用意いただくもの

・発表用ノートパソコンと発表データを保存したUSB メモリー

（ご注意）

発表用ノートパソコンに映像出力用のミニD-Sub15 ピン端子（メス）がない場合，液晶プロジェクターとの接続にノートパソコン付属（または別売り）のケーブル・アダプター類が必要となりますので，必ずご持参ください

（3）大会事務局にて準備するもの

・液晶プロジェクター
・接続ケーブル（ミニD-Sub15 ピン端子（オス））
・モニター切替器
・レーザーポインター

（4）発表の手順

1. パソコンを起動し，プレゼンテ－ション用ファイルを開く
2. 発表前にケーブルを接続する
3. 外部映像出力へ切り替える
4. 自分の発表時間が来たらモニターを切り替える
5. 発表する
6. 発表終了後，速やかにパソコンの接続ケーブルを取り外す

・発表会場内前方に液晶プロジェクターに接続するモニター切替器を準備しています。前演者の発表中にご自身のノートパソコンの切替器への接続を行い，次演者席で待機してください。

・必ず発表時間の前に着席し，時間に余裕をもって発表準備を行ってください。ご自身の発表の最大2件前から接続を行うことができます。

（5）確認・注意事項

1. 口頭発表をされる方は，ご自身のスライドの2枚目(演題等の表紙の次頁)に利益相反の申告をご提示頂きますようお願いいたします。なお，今回の発表に直接関係があるもののみ記載をお願い致します。
2. 以下の日本バイオマテリアル学会ホームページにCOI 開示（例）を掲載しておりますので，ご参照ください。http://kokuhoken.net/jsbm/about/coi.html
3. パソコン画面の外部映像出力への切替方法を，お手持ちのパソコンのマニュアル等によりご確認ください。Windows 機とMac OS 機，さらに機種やOS のバージョンによって切替方法が異なります。
4. パソコン画面の解像度（XGA, SXGA, SXGA+, WXGA など）をご確認ください。今回使用できる液晶プロジェクターはXGA（1024×768 ピクセル）まで表示が可能です。SXGA 以上の高解像度やワイド型パソコンのWXGA ですと正確に表示されない場合があります。

5. プレゼンテーションソフト（パワーポイントなど）の操作方法をご確認ください。
6. パソコンの起動（あるいはスリープ状態の解除）前に液晶プロジェクターと接続しておかないと映像出力が認識されない機種がありますので，充分ご注意ください（MacOS 機の一部等）。
7. 音声の接続は行いません。発表あるいは準備中にパソコンから音声・サウンドが出ないよう，予め設定してください。
8. 発表中にパソコンの画面が消えないよう電源や省電力機能の設定をご確認ください。
9. 大会事務局は発表用のパソコンを用意いたしません。
10. A会場では，パソコンの接続・モニター切替・操作等はオペレーターが行います。
11. B･C･D･E会場では，パソコンの接続・モニター切替・操作等はすべて発表者ご自身で行って頂きます。
12. パソコンのトラブルによる発表時間の延長は出来かねますのでご注意ください。

【２】一般演題（ポスター発表）

（1）ポスター会場

・ポスター会場は大会会場3 階エントランスホール・3 階レセプションホール（F 会場）となります。発表当日，会場前のポスター発表受付にて発表者用リボンをお受け取りください。

・ポスター発表は11 月12 日（月）と13 日（火）の日替わりで行います。

（2）ポスター貼付時間

・1日目は8：30～9：30, 2日目は9：00～9：30 の時間でお願いします。

（3）ポスター発表時間

・11月12日（月）は16：00～17：00，11月13日（火）は13：00～14：00をポスター発表時間（討論時間）とします。

・上記の討論時間中は，発表者用リボンをつけてご自身のポスターの前で待機してください。

（4）ポスター撤収時間

・11月12日（月）は17：00～17：30，11月13日（火）は14：00～14：30 にお願いします。

時間内に撤収されない場合は，大会事務局で処分します。

（5）パネルサイズ

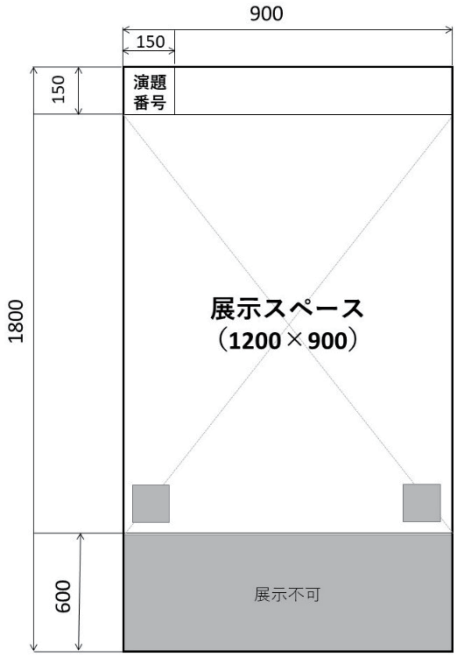
・パネルサイズは，縦180 ㎝，横90 ㎝です（縦長サイズ）貼り付け部分は縦120 ㎝，横90 ㎝です。

・パネルには大会事務局であらかじめ演題番号（15 ㎝×15 ㎝）を掲示しますので，該当パネルにポスターを掲示してください。押しピンを用意します。

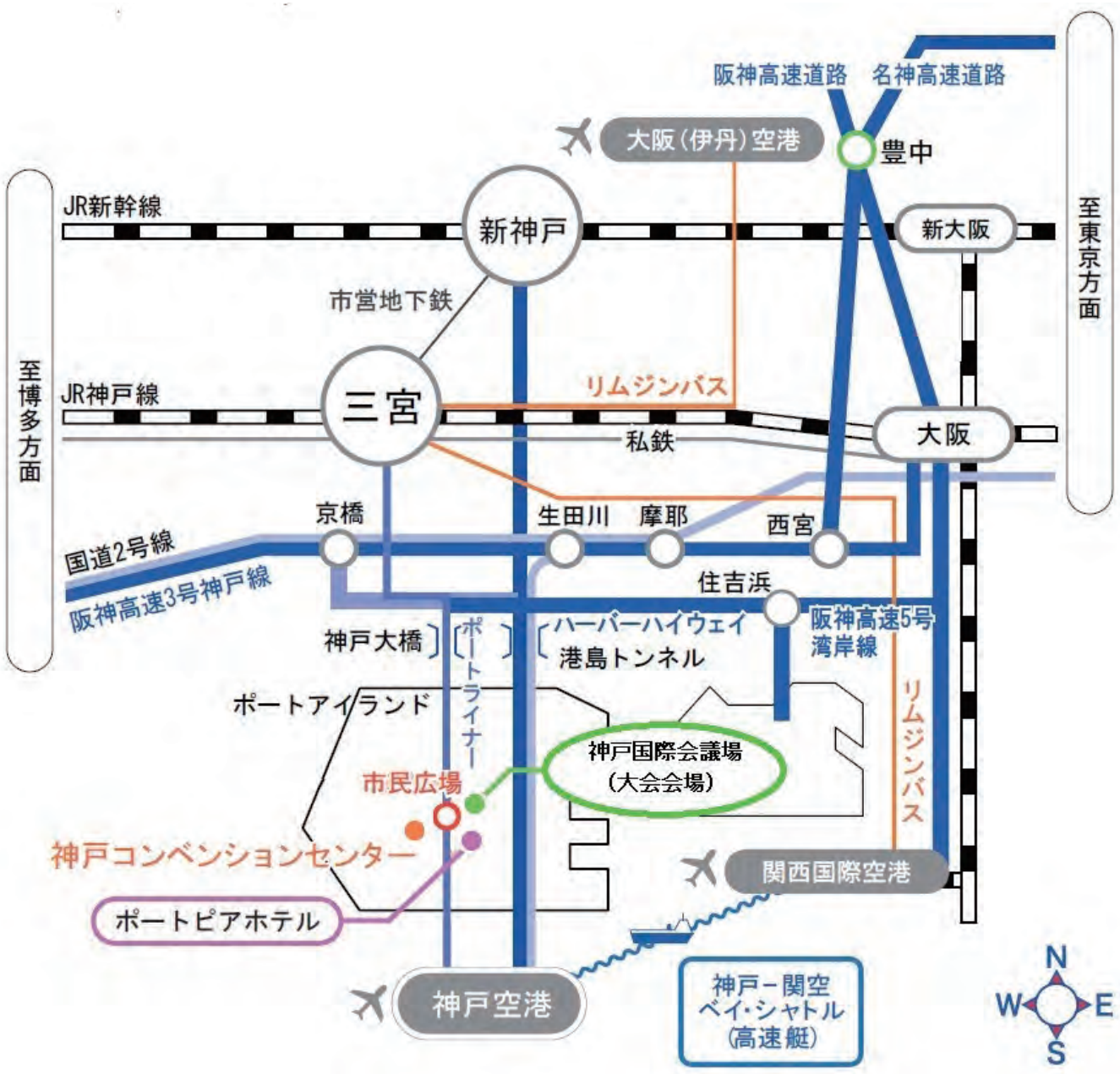
（6）優秀研究ポスター賞に応募された方へ

・優秀研究ポスター賞に応募された演題数が多かったために，予定を変更して, 11月12日（月）と13日（火）に分かれて発表して頂きます。選考結果は11月13日（火）の閉会式において発表し，賞状を授与しますので，応募された発表者は必ず閉会式に出席して下さい。

ポスター展示姿図（mm）



会場までのご案内

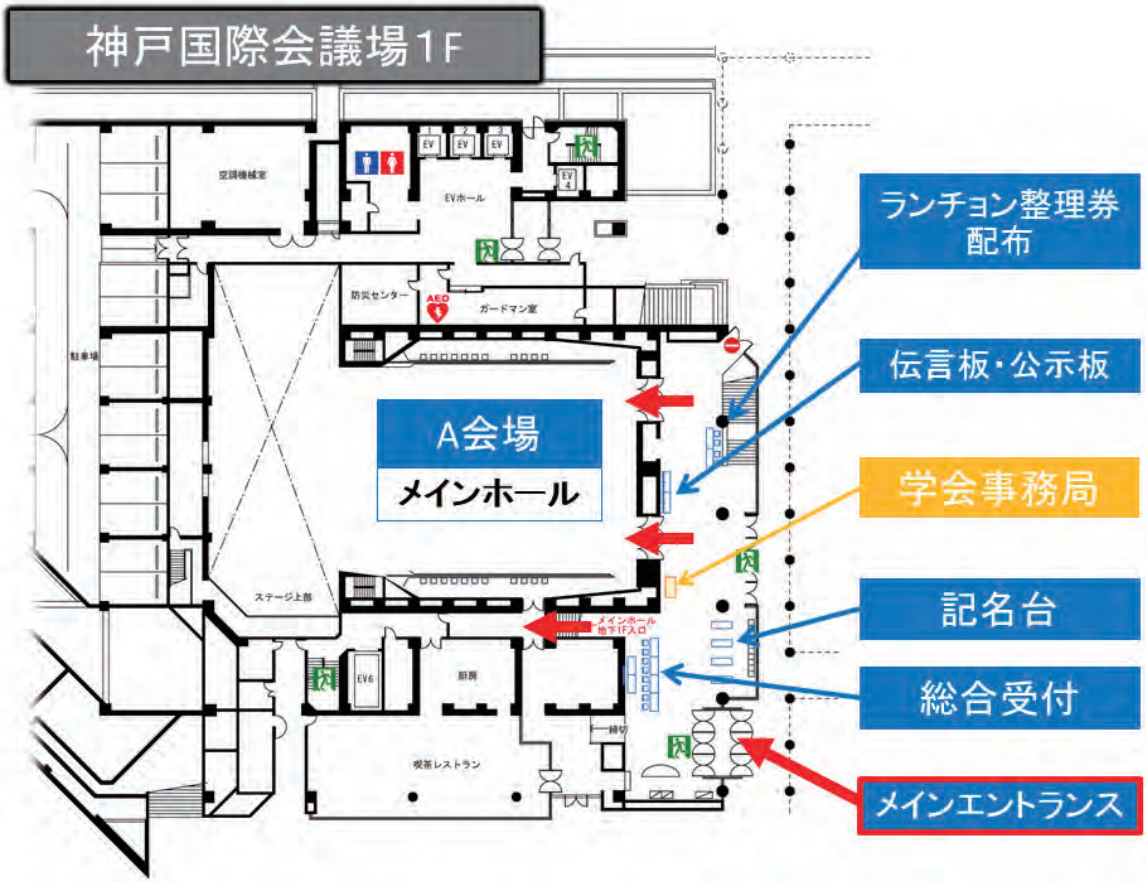

阪神高速道路
名神高速道路
大阪（伊丹）空港
豊中
至東京方面
JR新幹線
新神戸
新大阪
市営地下鉄
至博多方面
JR神戸線
三宮
リムジンバス
大阪
私鉄
京橋
生田川
摩耶
西宮
国道2号線
阪神高速3号神戸線
住吉浜
神戸大橋
ポートライナー
ハーバーハイウェイ
港島トンネル
阪神高速5号
湾岸線
ポートアイランド
リムジンバス
神戸国際会議場
（大会会場）
市民広場
神戸コンベンションセンター
関西国際空港
ポートピアホテル
神戸空港
神戸－関空
ベイ・シャトル
（高速艇）
N
W
E
S

会場案内図

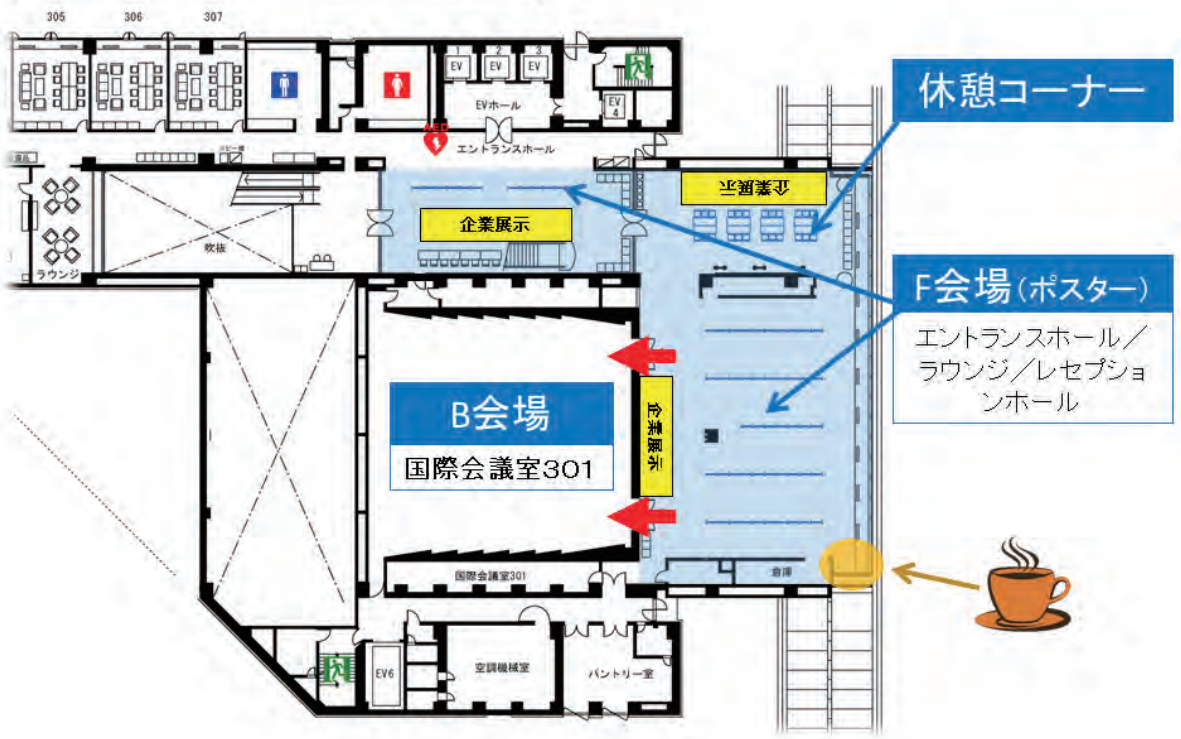
神戸国際会議場B1F



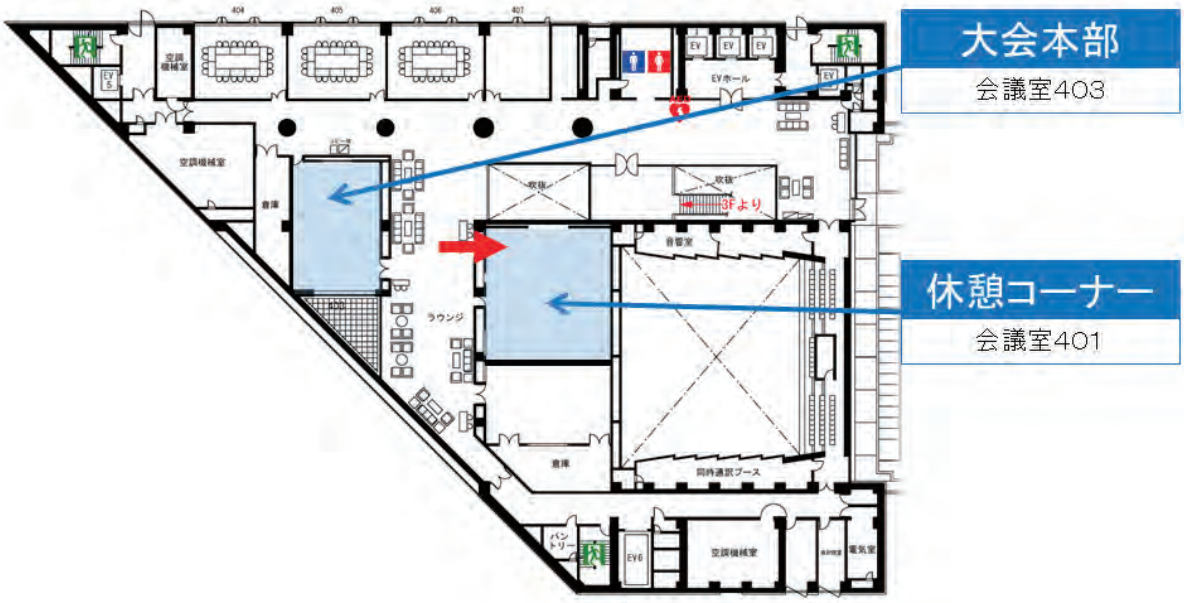
神戸国際会議場1F



神戸国際会議場3F



神戸国際会議場4F




神戸国際会議場5F
休憩コーナー
ラウンジ
E会場
会議室504＋505
C会場
会議室501
D会場
会議室502

第 40 回日本バイオマテリアル学会大会
協賛一覧

ランチョンセミナー協賛企業（５０音順）

株式会社ジェイ・エム・エス

株式会社島津製作所

物質・材料研究機構　STAM編集室

株式会社リガク

商品展示企業（５０音順）

オレンジサイエンス合同会社

カクタス・コミュニケーションズ株式会社

株式会社化合物安全性研究所

クラボウ

株式会社ジーシー

株式会社ジャパン・ティッシュ
・エンジニアリング

株式会社新組織科学研究所

ストレックス株式会社

DIC株式会社

ティー・エイ・インスツルメント
・ジャパン株式会社

東京化成工業株式会社

株式会社東レリサーチセンター

日精バイリス株式会社

一般社団法人　日本再生医療学会

株式会社ファーマビヨンド

フィルジェン株式会社

富士フィルム株式会社

ブルカージャパン株式会社

八十島プロシード株式会社

株式会社ヤマト

協賛企業（５０音順）

大阪冶金興業株式会社

東洋紡株式会社

ナガセケムテックス株式会社

日本特殊陶業株式会社

ポケットプログラム広告掲載（５０音順）

DIC株式会社

デンカ株式会社

新田ゼラチン株式会社

オリンパス テルモ バイオマテリアル株式会社

第40回日本バイオマテリアル学会大会の開催にあたり，上記企業から多大なご支援を賜りました。

ここに謹んで御礼申し上げます。

第４０回日本バイオマテリアル学会大会

大会長　　山　岡　　哲　二

第40回日本バイオマテリアル学会大会運営体制

大 会 長　山岡　哲二　（国立循環器病研究センター研究所）

組織委員会

石川　邦夫　(九州大学)
今里　聡　(大阪大学)
岩﨑　泰彦　(関西大学)
菊池　明彦　(東京理科大学)
岸田　晶夫　(東京医科歯科大学)
鈴木　治　(東北大学)
中野　貴由　(大阪大学)
由井　伸彦　(東京医科歯科大学)

運営委員会

秋吉　一成　(京都大学)
石坂　春彦　(帝人ナカシマメディカル株式会社)
大矢　裕一　(関西大学)
小川　哲朗　(オリンパス テルモ バイオマテリアル株式会社)
田中　秀典　(東洋紡株式会社)
田畑　泰彦　(京都大学)
長崎　幸夫　(筑波大学)
橋本　典也　(大阪歯科大学)
平野　義明　(関西大学)
松本　卓也　(岡山大学)
宮田　隆志　(関西大学)
名井　陽　(大阪大学)
森本　尚樹　(関西医科大学)

実行委員会

麻生　隆彬　(大阪大学)
石本　卓也　(大阪大学)
大谷　亨　(神戸大学)
岡田　正弘　(岡山大学)
柿木　佐知朗　(関西大学)
神戸　裕介　(国立循環器病研究センター研究所)
児島　千恵　(大阪府立大学)
佐々木　淳一　(大阪大学)
佐々木　善浩　(京都大学)
城　潤一郎　(京都大学)
長濱　宏治　(甲南大学)
橋本　朋子　(奈良女子大学)
原田　敦史　(大阪府立大学)
本田　義知　(大阪歯科大学)
松垣　あいら　(大阪大学)
松崎　典弥　(大阪大学)
馬原　淳　(国立循環器病研究センター研究所)
弓場　英司　(大阪府立大学)
和久　友則　(京都工芸繊維大学)

日程表 11月12日（月）（Ⅰ：基礎マテリアル、Ⅱ：マテリアル機能、Ⅲ：非臨床POC、Ⅳ：産業化・標準化）

	A会場 1F　メインホール	B会場 3F　301国際会議室	C会場 5F　501号室	D会場 5F　502号室	E会場 5F　504+5号室	F会場 3F　レセプションホール
8:30	会場・参加受付					8:30～9:30 ポスター貼付
9:30	開会式					
	9:40～10:25 特別講演1 講師：Jons.Hilborn 座長：石原　一彦					
10:00						9:30～16:00 ポスター展示 循環器 1P-001 ～ 005 整形外科 1P-006 ～ 013 歯科口腔外科 1P-014 ～ 022 免疫・ガン 1P-023 ～ 025 DDS・創薬 1P-026 ～ 049 組織工学 1P-050 ～ 076 診断・計測技術 1P-077 ～ 085 イメージング 1P-086 ～ 089 その他 1P-090 ～ 115
10:30	10:30～11:30 奨励賞受賞講演（1） 石本　卓也 奨励賞受賞講演（2） 東　大志	10:30～12:00 組織工学 Ⅱ/Ⅲ 座長：田口　哲志 松崎　典弥	10:30～12:00 整形外科 ・歯科口腔外科 （細胞・組織） Ⅱ 座長：佐々木　淳一 松垣　あいら	10:30～12:00 整形外科 （合成高分子） Ⅰ/Ⅱ 座長：岩崎　倫政 荏原　充宏	10:30～12:00 診断・計測 ・イメージング （合成高分子） Ⅰ/Ⅱ 座長：岡村　陽介 城　潤一郎	
11:30						
12:00		12:00～13:00 ランチョンセミナー 1B-LS1 ㈱ジェイエムエス	12:00～13:00 ランチョンセミナー 1C-LS2 ㈱リガク			
12:30						
13:00	13:00～15:00 シンポジウム１ 「Scaffolds for Regenerative Medicine」 座長： 森本　尚樹、今里　聡 講師： 山岡　哲二、名井　陽 森本　尚樹、黒部　裕嗣	13:00～14:15 産業化・標準化 Ⅲ/Ⅳ 座長：藪島　由二	13:00～16:00 組織工学 （細胞・組織） Ⅰ/Ⅱ 座長：岡田　正弘 川添　直輝、小林　純	13:00～16:00 歯科口腔外科 （金属・セラミック） Ⅰ/Ⅱ 座長：菊池　正紀 鈴木　治、成島　尚之	13:00～16:00 DDS・創薬 （合成高分子） Ⅰ/Ⅱ 座長：大矢　亨 佐々木 善浩、原田 敦史	
13:30						
14:00						
14:30		14:15～16:00 組織工学 Ⅰ/Ⅱ 座長：寺村　裕治 中山　正道				
15:00						
15:30						
16:00	ポスタービューイング／ポスターセッション					16:00～17:00 ポスター討論
16:30						
17:00	17:00～17:30 評議員会・総会					17:00～17:30 ポスター撤収
17:30	表彰式					
18:00	17:40～18:10 学会賞受賞講演 菊池　明彦					
18:30	18：30～20：30 懇親会（アリストンホテル・１６Ｆバルセロナホール）					
19:00						

日程表 11月13日（火）（Ⅰ：基礎マテリアル、Ⅱ：マテリアル機能、Ⅲ：非臨床POC、Ⅳ：産業化・標準化）

	A会場 1F　メインホール	B会場 3F　301国際会議室	C会場 5F　501号室	D会場 5F　502号室	E会場 5F　504+5号室	F会場 3F　レセプションホール
9:00 9:30	9:00〜11:00 **シンポジウム２** 「Cardiovascular Biomaterials」 座長： 伊藤　敦夫、簗谷　朋典 講師： 簗谷　朋典、德永　滋彦 田中　裕史、梅津　光生	9:00〜11:45 **整形** **・歯科口腔外科** **Ⅲ/Ⅳ** 座長：堤　祐介 富田　直秀、本田　義知	9:00〜11:15 **日本学術会議** **シンポジウム** 座長：由井　伸彦 講師：砂　真一郎 村上　望、仲山　賢一 春日　敏宏、中野　貴由	9:00〜10:30 **循環器** **・歯科口腔外科** **（合成高分子）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：新留　琢郎 馬原　淳	9:00〜10:30 **組織工学** **（生体由来材料）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：玉田　靖 干場　隆志	9:00〜9:30 ポスター貼付
10:00 10:30				10:30〜11:45 **整形外科** **（金属・セラミック）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：石本　卓也	10:30〜12:00 **免疫・ガン** **（合成高分子）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：田中　賢 山本　雅哉	9:30〜13:00 **ポスター展示** **循環器** 2P-001 〜 004 **整形外科** 2P-005 〜 010 **歯科口腔外科** 2P-011 〜 019 **免疫・ガン** 2P-020 〜 023 **DDS・創薬** 2P-024 〜 044 **組織工学** 2P-045 〜 074 **診断・計測技術** 2P-075 〜 083 **イメージング** 2P-084 〜 086 **その他** 2P-087 〜 114 **【日韓 AWARD】** 2P-115 〜 117
11:00 11:30			11:15〜12:00 **組織工学** **（合成高分子）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：高橋　宏信			
12:00 12:30		12:00〜13:00 **ランチョンセミナー** 2B-LS3 **物質・材料研究機構** **STAM編集室**	12:00〜13:00 **ランチョンセミナー** 2C-LS4 **(株)島津製作所**			
13:00 13:30	ポスタービューイング／ポスターセッション					13:00〜14:00 **ポスター討論**
14:00		14:00〜15:15 **DDS・創薬** **Ⅱ/Ⅲ** 座長：西山　伸宏	14:00〜17:00 **組織工学** **（合成高分子）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：有馬　祐介 井上　裕貴、児島　千恵	14:00〜17:00 **整形外科** **（金属・セラミック）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：石川　邦夫 伊藤　敦夫、松本　卓也	14:00〜16:00 **免疫・ガン** **（合成高分子** **・生体由来材料）** **Ⅰ／Ⅱ** 座長：大矢根　綾子 柿木　佐知朗	14:00〜14:30 ポスター撤収
14:30	14:15〜15:00 **特別講演２** 講師：上野　高義 座長：山岡　哲二					
15:00 15:30	15:00〜16:30 **教育講演** 「バイオマテリアルの基礎研究から製品化・標準化に向けて」 座長：菊池　明彦 講師：田村　篤志 山本　雅哉、白土　治己	15:15〜17:00 **循環器** **Ⅱ/Ⅲ** 座長：緒方　藍歌 木村　剛				
16:00 16:30					16:00〜17:00 **DDS・創薬** **（合成高分子）** **Ⅰ/Ⅱ** 座長：岩﨑　泰彦	
17:00 17:30	17:15-17:30 **閉会式・次年度大会案内**					
18:00 18:30 19:00						

プログラム（口頭発表）第１日：11月12日（月）

A会場（1F　メインホール）　午前

9：30～9：40　　開会式

大会長　山岡哲二（国立循環器病研究センター研究所）

会　長　由井伸彦（東京医科歯科大学）

9：40～10：25　　特別講演１

座長：石原一彦（東京大学）

1A-KL1　**Advanced design of hydrogel matrices for tissue regeneration**

Jons.Hilborn（Department of Chemistry, Ångström Laboratory, Uppsala University, 東京大学大学院バイオエンジニアリング専攻）

10：30～11：30　日本バイオマテリアル学会奨励賞　受賞講演

座長：松本卓也（岡山大学）

1A-IL1　**骨コラーゲン／アパタイト結晶配向性の定量的解析と骨再生機構解明**

石本卓也（大阪大学大学院）

1A-IL2　**ホスト－ゲスト相互作用を利用したPEG化技術によるタンパク質の製剤特性の改善**

東　大志（熊本大学大学院生命科学研究部,熊本大学大学院先導機構）

13：00～15：00　シンポジウム１　Scaffolds for Regenerative Medicine

座長：森本尚樹（関西医科大学）・今里　聡（大阪大学）

1A-S1-1　**脱細胞化組織のin vivo評価　― 許容されるECMの変化 ―**

山岡哲二（国立循環器病研究センター）

1A-S1-2　**人工骨と骨再生ー研究と実用化の動向**

名井　陽（大阪大学医学部附属病院未来医療センター）

1A-S1-3　**不活性化自家皮膚組織を利用した母斑組織の治療**

森本尚樹（関西医科大学形成外科）

1A-S1-4　**生体分解性素材を用いた医療デバイス開発とその現状**

黒部裕嗣（徳島大学心臓血管外科）

17：00～17：30　評議員会・総会

17：30～17：40　表彰式

17：40～18：10　学会賞受賞講演

座長：鈴木　治（東北大学）

1A-IL3　**血糖診断のための温度応答性高分子微粒子の創成**

菊池明彦（東京理科大学）

B会場（3F　301国際会議室）　午前

10：30〜12：00　組織工学　II／III

座長：田口哲志（物質・材料研究機構）・松崎典弥（大阪大学）

1B-01　**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, [2]Uppsala University, Department of Immunology, Genetics and Pathology, [3]Lund University Hospital Department of Transplantation, [4]Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences

○寺村裕治[1,2], Sana Asif[2], Alireza Biglarnia3, Kristina Nilsson-Ekdahl[2], Marianne Jensen-Waern[4], Bo Nilsson[2]

1B-02　**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，[3]JSTさきがけ

○末松良隆[1]，武岡真司[1]，藤枝俊宣[2,3]

1B-03　**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

1B-04　**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

1B-05　**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ニクス研究拠点, 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], 舩本誠一[2,3], 岸田晶夫[2]

1B-06　**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**

物質・材料研究機構バイオ機能分野

○西口昭広, 田口哲志

12：00〜13：00　ランチョンセミナー　協賛：(株)ジェイエムエス

座長：山岡哲二（国立循環器病研究センター研究所）

1B-LS1　**日本バイオマテリアル学会　設立40周年記念企画**

由井伸彦　（東京医科歯科大学）

鈴木　治　（東北大学）

B会場（3F　301国際会議室）　午後

13：00〜14：15　産業化・標準化　III/IV

座長：葩島由二（国立医薬品食品衛生研究所）

1B-07　**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

1B-08　**生体適合性ポリマーと中間水の構造、運動性の相関**

㈱東レリサーチセンター

○中田　克

1B-09　**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, [2]名古屋大学　大学院創薬科学研究科　細胞分子情報分野, [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]

1B-10　**経内視鏡的に導入可能なコラーゲンゲ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]

1B-11　**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]

14：15〜16：00　組織工学　I / II

座長：寺村裕治（東京大学）・中山正道（東京女子医科大学）

1B-12　**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

1B-13　**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]

1B-14　**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]

1B-15　**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] 国立研究開発法人 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]

1B-16　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]

1B-17　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]

1B-18　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]

C会場（5F　501号室）　午前

10：30〜12：00　整形外科・歯科口腔外科（細胞・組織）　II

座長：佐々木淳一（大阪大学）・松垣あいら（大阪大学）

1C-01　**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**

[1]東京医科歯科大学大学院整形外科学分野, [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

○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]

1C-02　**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]

1C-03　**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**

[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

○植村壽公[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]

1C-04　**骨親和性ポリリン酸エステルと破骨細胞との相互作用**

[1]関西大学 化学生命工学部, [2]関西大学 ORDIST, [3]東京医科歯科大学生体材料工学研究所, [4]大阪医科大学 整形外科学教室

○岩﨑泰彦[1,2], 大高晋之[2], 中村美穂[3], 横田敦司[4], 根尾昌志[4]

1C-05　**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]

1C-06　**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. Abe[1], Aifang Han[1], Seongjin Shin[3], Ji-Myung Bae[3], 今里　聡[1,4]

12：00〜13：00　　ランチョンセミナー　　協賛：(株)リガク

座長：中野貴由（大阪大学）

1C-LS2　　**X線を利用した生体およびバイオマテリアルの評価法について**

〜X線回折・X線イメージングで見えるバイオ材料〜

佐々木勝成　（株式会社リガク　X線機器事業部　X線イメージング設計部）

C会場（5F　501号室）　午後

13：00〜16：00　組織工学（細胞・組織）　I / II

座長：岡田正弘（岡山大学）・川添直輝（物質・材料研究機構）

小林　純（東京女子医科大）

1C-07　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]

1C-08　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]，下田亮太[2]，石原正統[3]，沖川侑揮[3]，長谷川雅考[3]

1C-09　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

1C-10　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砕法による継代システムの開発

[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

○植村壽公[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]

1C-11　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]

1C-12　Novel bioengineered surface design for the expansion of mesenchymal stem cells

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

○Shakya Ajay，今戸瑛二、Nguyen Kim Phuong、松山たまも、堀本光太朗、平田伊佐雄、加藤功一

1C-13　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

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，岡田正弘，松本卓也

1C-14　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]

1C-15　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, [2]Ewha Womans University, College of Pharmacy, [3]早稲田大学　理工学術院

○秋山義勝[1], Hyo Kyoung KWON[2]，原口裕次[1]，坂口勝久[3]，大和雅之[1], Hyukjin LEE[2]，清水達也[1]

1C-16　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ﾌﾛﾝﾃｨｱｾﾝﾀｰ, [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]

1C-17　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]

1C-18　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]

D会場（5F　502号室）　午前

10：30〜12：00　整形外科（合成高分子）　I / II

座長：岩崎倫政（北海道大学）・荏原充宏（物質･材料研究機構）

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], 薮塚武史[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]

1D-02　**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**

北海道大学大学院医学研究院整形外科学教室

○髙橋大介, テルカウイ　アラー, 松前　元, 田　園, アルハサン　ヘンドウ, 濱崎雅成, 岩崎倫政

1D-03　**人工関節ポリエチレン摩耗粉による炎症反応に対する好中球の重要な役割**

北海道大学医学部整形外科教室

○テルカウイ アラー, ヘンド　アルハサン, 松前　元, 髙橋大介, 岩崎倫政

1D-04　**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]

1D-05　**骨再生足場としての生分解性コアセルベート液滴ー炭酸アパタイト複合カプセルの調製**

[1]東京理科大学大学院基礎工, [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]

1D-06　**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]東京理科大院基礎工, [2]物材機構（NIMS）国際ナノアーキテクトニクス研究拠点（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]

D会場（5F　502号室）　午後

13：00〜16：00　歯科口腔外科（金属・セラミック）　I / II

座長：菊池正紀（物質・材料研究機構）・鈴木　治（東北大学）
成島尚之（東北大学）

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付属病院

○大石達也[1], 堤　祐介[2], 加嶋祐佳[1,3], 髙市敦士[4], 陳　鵬[2], 蘆田茉希[2], 土居　壽[2], 塙　隆夫[2]

1D-08　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]

1D-09　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]

1D-10　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]

1D-11　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]

1D-12　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　機能性材料拠点　微粒子工学グループ

○岩波佳緒里[1,2], 打越哲郎[3], 上園将慶[1], 菊池正紀[2], 森山啓司[1]

1D-13　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], 蔀佳奈子[2], 眞弓佳代子[2], 宮治裕史[2]

1D-14　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ソフトマテリアル学際化学分野, [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]

1D-15 **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**

東北大学大学院工学研究科

○上田恭介, Wu Jun, 成島尚之

1D-16 **銀または銅をドープ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], 金髙弘恭[2]

1D-17 **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]

1D-18 **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], 酒島由二[1]

E会場（5F　504+5号室）　午前

10：30〜12：00　診断・計測・イメージング（合成高分子）　I / II

座長：岡村陽介（東海大学）・城　潤一郎（京都大学）

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**

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○合田達郎, 宮原裕二

1E-02　**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]㈱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]

1E-03　**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]

1E-04　**撥水性超薄膜を活用したカバーグ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]

1E-05　**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]、

1E-06　**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

E会場（5F　504+5号室）　午後

13：00〜16：00　DDS・創薬（合成高分子）　I / II

座長：大矢　亨（神戸大学）・佐々木善浩（京都大学）
原田敦史（大阪府立大学）

1E-07　**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]

1E-08　**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**

神戸大学大学院・工学研究科応用化学専攻

○大谷　亨，山本一裕

1E-09　**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]関西大学化学生命工，[2]関西大学ORDIST

○魚住　葵[1]，河村暁文[1,2]，宮田隆志[1,2]

1E-10　**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

1E-11　**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**

[1]神戸大院工，[2]神戸大院医，[3]東大院医

○北山雄己哉[1]，山田託也[1]，木口健太朗[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]

1E-12　**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]

1E-13　**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**

[1]関西大学化学生命工学部，[2]関西大学ORDIST，[3]関西大学医工薬連携研究センター

○山本洋輝[1]，能﨑優太[2]，葛谷明紀[1,3]，大矢裕一[1,3]

1E-14　**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

1E-15　**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マテリアル工学専攻，[2]東大院医，[3]九大院工，[4]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]

1E-16　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

〇井上文仁，佐々木善浩，澤田晋一，秋吉一成

1E-17　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

〇朝山章一郎[1]，種市さくら[1]，川上浩良[1]，根岸洋一[2]

1E-18　超音波をトリガーとした薬物除法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相関基礎科学系

〇中田大貴[1]，豊田太郎[2]，吉田憲司[1]，林　秀樹[1]

プログラム（口頭発表）第２日：11月13日（火）

A会場（1F　メインホール）　午前

9：00〜11：00　　シンポジウム2　Cardiovascular Biomaterials

座長：伊藤敦夫（産業技術総合研究所）・築谷朋典（国立循環器病研究センター研究所）

2A-S2-1　**製品化を見据えた人工臓器開発におけるマテリアルの重要性**

〇築谷朋典，水野敏秀，武輪能明，巽　英介（国立循環器病研究センター）

2A-S2-2　**機械弁の素材と生体弁の固定法：術後抗凝固療法と長期遠隔成績**

徳永滋彦（JCHO九州病院心臓血管外科）

2A-S2-3　**人工血管の現状と問題点**

田中裕史（神戸大学大学院医学系研究科）

2A-S2-4　**革新的医療機器の早期承認のためのバイオエンジニアの役割**

〇梅津光生，岩﨑清隆，松橋祐輝，坪子侑佑，笠貫　宏（早稲田大学医療レギュラトリーサイエンス研究所）

14：15〜15：00　　特別講演２

座長：山岡哲二（国立循環器病研究センター研究所）

2A-KL2　**組織再生を応用した心疾患に対する新たなアプローチの開発**

上野高義（大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科）

15：00〜16：30　　教育講演「バイオマテリアルの基礎研究から製品化・標準化に向けて」

座長：菊池明彦（東京理科大学）

2A-EL1　**ドラッグデリバリーシステム：マテリアルの基礎と臨床応用**

田村篤志（東京医科歯科大学生体材料工学研究所）

2A-EL2　**体外での３次元組織様構築物の創製を目指したバイオマテリアル**

山本雅哉（東北大学大学院工学研究科）

2A-EL3　**承認審査から見た医療機器の開発**

白土治己（医薬品医療機器総合機構医療機器審査第三部）

B会場（3F　301国際会議室）　午前

9：00～11：45　整形・歯科口腔外科　III/IV

座長：堤　祐介（東京医科歯科大学）・富田直秀（京都大学）
本田義知（大阪歯科大学）

2B-01　**整形外科向け癒着防止材の開発**

株式会社ジェイ・エム・エス　研究開発本部

○井手純一，上泉千草，山科憂佳，山本敬史

2B-02　**医工連携による次世代型脊柱変形矯正用インプラントの開発戦略**

[1]北海道大学病院整形外科，[2]北海道大学情報科学研究科，[3]東北大学金属材料研究所

○須藤英毅[1]，金井　理[2]，小甲晃史[1]，青柳健太[3]，王　昊[3]，岩崎倫政[1]，千葉晶彦[3]

2B-03　**骨軟骨柱移植術に高純度アルギン酸ゲル（UPAL ゲル）移植を併用した治療効果の検討**

北海道大学大学院　医学研究院　専門医学部門　機能再生医学分野　整形外科学教室

○菱村亮介，小野寺智洋，宝満健太郎，金　佑泳，濱崎雅成，徐　亮，岩崎倫政

2B-04　**OCP/Collagenの実用化**

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

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

2B-05　**リコンビナントペプチド「セルネスト」を用いた骨補填材の開発**

富士フイルム株式会社バイオサイエンス＆テクノロジー開発センター

○我妻昭彦，岡村　愛，平塚崇浩，柿沼千早，前川敏彦，畠賢一郎

2B-06　**バイオマテリアルのin vitro生体活性評価法の標準化に向けて -GLOBALプロジェクト**

[1]中部大学生命健康科学部，[2]Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, Italy

○山口誠二[1]，高玉博朗[1]，Sara Ferraris[2]，Enrica Verne[2]，Francesco Baino[2]，Marta Miola[2]
Veronica Peretti[2]，Silvia Spriano[2]

2B-07　**医療技術のQOLデザイン**

京都大学工学研究科

○富田直秀

2B-08　**リン酸オクタカルシウムが破骨細胞－骨芽細胞間クロストークに与える効果**

[1]東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野，[2]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，[3]東北大学大学院歯学研究科口腔システム補綴学分野

○鈴木　治[1]，塩飽由香利[1,2]，土屋香織[1]，肖　凌浩[1,3]，佐々木啓一[3]

2B-09　**生体吸収性マグネシウム合金の分解に伴う空孔形成挙動評価手法開発**

[1]物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点，[2]ワルシャワ工科大材料科学工学科

○山本玲子[1]，菊田明美[1]，Fillip Witkowski[2]，Wojciech Święszkowski[2]

2B-10 **気孔径が炭酸アパタイトハニカムの骨伝導性に及ぼす影響**

[1]九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野, [2]福岡歯科大学生体工学分野, [3]産総研四国センター
○石川邦夫[1], 林幸壱朗[1], 土谷　享[1], 都留寛治[1,2], 杉浦悠紀[1,3]

2B-11 **The enhanced osseointegration of a novel implant antibacterial coating**

[1]School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, China, [2]Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan.
○Koamg Wu[1, 2], Huifang Ren[1], Yicheng Cheng[1]

12：00〜13：00　　ランチョンセミナー　　協賛：物質・材料研究機構　STAM編集室

2B-LS3 **バイオマテリアル研究者のためのオープンアクセス出版ガイド**
ーハゲタカジャーナルに狙われないためにー

内藤昌信　（STAM副編集長、物質・材料研究機構統合型材料開発・情報基盤部門）

B会場（3F　301国際会議室）　午後

14：00〜15：15　DDS・創薬　II/III

座長：西山伸宏（東京工業大学）

2B-12　**Management of Tumorigenic Potential of Triple Negative Breast Cancer by Nitroxide Radical-containing Nanoparticles**

[1]Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan, [2]Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

○Babita Shashni[1], Yukio Nagasaki[1,2]

2B-13　**リポソーム内部におけるポリマー合成による機能性カプセルの開発**

慶應義塾大学大学院理工学研究科高分子化学研究室

○杉本　光，福井有香，藤本啓二

2B-14　**コレステロール修飾相補鎖RNAを用いたmRNA搭載高分子ミセル安定化**

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

○内田智士[1,2]，吉永直人[1,2]，長田健介[1]，位高啓史[3], Horacio Cabral[1]，片岡一則[1,4]

2B-15　**生体膜ハイブリッドナノ粒子の構築とバイオ機能評価**

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻

○名倉百華，澤田晋一，佐々木善浩，秋吉一成

2B-16　**生体接着型オプトエレクトロニクスによる局所光線力学療法**

[1]早稲田大学高等研究所, [2]JSTさきがけ, [3]早稲田大学大学院先進理工学研究科, [4]京都大学大学院医学研究科, [5]東京大学大学院医学系研究科, [6]防衛医科大学校生理学講座

○藤枝俊宣[1,2]，山岸健人[3]，桐野　泉[4]，高橋　功[3]，天野日出[5]，武岡真司[3]，守本祐司[6]

15：15〜17：00　循環器　II/III

座長：緒方藍歌（名古屋大学）、木村　剛（東京医科歯科大学）

2B-17　**ミトコンドリア強化幹細胞（MITO Cell)を用いた細胞移植療法の検証**

[1]北海道大学大学院薬学研究院, [2]北海道大学病院　小児科

○山田勇磨[1]，阿部二郎[2]，佐々木大輔[2]，武田充人[2]，原島秀吉[1]

2B-18　**ペプチド修飾脱細胞小口径血管の組織再生プロセスと開存性**

[1]国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部, [2]関西大学　化学生命工学部

○馬原　淳[1]，古島健太郎[1,2]，平野義明[2]，山岡哲二[1]

2B-19　**生分解性インジェクタブルポリマーを用いた脂肪由来幹細胞の局注による虚血性心疾患治療**

[1]関西大ORDIST, [2]関西大化学生命工学部, [3]大阪医大, [4]関西大医工薬連携研究センター

○能崎優太[1]，髙井宏樹[2]，藤原壮一郎[2]，伊井正明[3]，打田裕明[3]，根本慎太郎[3]，葛谷明紀[2,4]，大矢裕一[2,4]

2B-20　**生分解性の異なるシルクゲル注入による心筋ネガティブリモデリングの抑制**

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

○神戸裕介，山岡哲二

2B-21　脱細胞化小口径動脈グラフトの作製とin vivo評価

[1]東京医科歯科大学生体材料工学研究所 物質医工学, [2]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所　脱細胞化再生医療材料学研究部門, [3]物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点

○橋本良秀[1,2], 山下暁立[2], 張　永巍[1,2], 舩本誠一[1,2,3], 岸田晶夫[1]

2B-22　生体吸収性マグネシウム合金スキャフォールドの経皮的冠動脈インターベンションへの応用

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

○佐々木誠[1], 山本玲子[2], 新留琢郎[3]

2B-23　組織工学材料を指向したシルクフィブロイン／生分解性ポリマー混合不織布の創製

[1]東京農工大学　生命工学専攻, [2]東京農工大学　共同獣医学科, [3]日本医科大学 循環器内科

○中澤靖元[1], 服部夏衣[1], 沼田香織[1], 村上智亮[2], 太良修平[3]

C会場（5F　501号室）　午前

9：00〜11：15　日本学術会議シンポジウム

共催：日本学術会議材料工学委員会バイオマテリアル分科会

座長：由井伸彦（東京医科歯科大学）

近年バイオマテリアルがカバーする研究領域はますます広がっています。しかしながら、研究資金や研究環境は十分ではなく、その一つの要因は研究資金や環境を提供する側と研究者の理解や意識の隔たりと考えられます。そこで、日本学術会議材料工学委員会バイオマテリアル分科会が中心となり、文部科学省やAMEDの担当者とバイオマテリアル研究者との交流の場となるシンポジウムを開催することとしました。多くの学会関係者の参加をお待ちしています。

2C-S3-1　**文部科学省における医療技術開発の支援及びナノテクノロジー・材料科学技術の推進**

砂　真一郎（文部科学省研究振興局ライフサイエンス課）

村上　望　（文部科学省研究振興局参事官（ナノテクノロジー・物質・材料担当）付）

2C-S3-2　**医療機器研究開発とバイオマテリアル**

仲山賢一　（日本医療研究開発機構　産学連携部　医療機器研究課）

2C-S3-3　**医療技術の高度化に向けたバイオマテリアルデザインとその製品化**

春日敏宏　（ 名古屋工業大学大学院工学研究科）

2C-S3-4　**医歯薬工連携研究に於けるハードルと夢〜生体材料工学研究者の立場から**

中野貴由　（大阪大学大学院工学研究科）

11：15〜12：00　組織工学（合成高分子）　I / II

座長：高橋宏信（東京女子医科大学）

2C-01　**PMEA/水界面の微細構造形成における分子量効果と生体親和性との相関**

[1]九州大学大学院工学府, [2]九州大学先導物質化学研究所, [3]山形大学有機材料システム研究推進本部

○馬渡なみ[1], 園田敏貴[1], 村上大樹[1,2], 田中　賢[1,2,3]

2C-02　**リン脂質ポリマーハイドロゲルネットワークに捕捉された細胞の増殖と組織化**

[1]Department of Bioengineering, [2]Department of Materials Engineering, School of Engineering, the University of Tokyo

○Ren ZHANG[1], Tomohiro KONNO[1], Yuuki INOUE[2], Kazuhiko ISHIHARA[1,2]

2C-03　**金属製培養器を用いた熱刺激によるMCF-7とヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）の殺細胞効果の検討**

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

○井田雄太[1]，倉科佑太[2]，宮田昌悟[3]，竹村研治郎[3]，小茂鳥潤[3]

12：00〜13：00　　ランチョンセミナー　　協賛：(株)島津製作所

座長：中野貴由　（大阪大学）

2C-LS4　　**バイオマテリアル評価をサポートする強度評価と微細内部構造観察**

－材料試験機・マイクロフォーカスX線CTとそのアプリケーションのご紹介－

岩本 剛　((株)島津製作所 NDIビジネスユニット)

横田明善　((株)島津製作所 試験機ビジネスユニット)

C会場（5F　501号室）　午後

14：00〜17：00　組織工学（合成高分子）　I / II

座長：有馬祐介（京都大学）・井上裕貴（東京大学）
児島千恵（大阪府立大学）

2C-04　肝臓細胞機能を向上させるための硫酸化ポリロタキサン表面の設計

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

○有坂慶紀, 由井伸彦

2C-05　傾斜ジブロックポリマーブラシ構造が細胞接着と移動に与える影響

東京大学工学系研究科

○松下大志, 東　倫之, 久代京一郎, 高井まどか

2C-06　可視光照射で単一細胞剥離を制御する高分子ナノ薄膜修飾基材の開発

早稲田大学大学院　先進理工学研究科

○山本光哉, 今任景一, 武田直也

2C-07　ポリマーを用いたバイオ由来素材の組織化と微細構造の制御

慶應義塾大学大学院理工学研究科高分子化学研究室

○南　裕之，福井有香，藤本啓二

2C-08　ムチンのポリマーグラフト化とバイオコーティング材料への応用

慶應義塾大学大学院理工学研究科高分子化学研究室

○徳生ひかる，福井有香，藤本啓二

2C-09　生分解性ナノゲル架橋ポーラスゲル材料の設計と機能評価

京都大学大学院工学研究科

○廣瀬　諒, 澤田晋一, 向井貞篤, 佐々木善浩, 秋吉一成

2C-10　細胞表面の混在分子が細胞間相互作用へ及ぼす影響

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

○有馬祐介, 磯部　潤

2C-11　中性子散乱による中間水の静的・動的構造解析

東レリサーチセンター

○中田　克

2C-12　刺激応答性リンクル薄膜によるハイドロゲルの接着制御

大阪大学大学院工学研究科

○加藤雅俊, 麻生隆彬, 宇山　浩

2C-13　皮膚の完全再生を目指したゲル状組織再生材の開発

[1]甲南大学大学院FIRST, [2]甲南大学FIRST

○小野公佳[1], 長濱宏治[2]

2C-14　アゾベンゼン基導入UCST型ウレイド高分子の相分離挙動の光制御

[1]東京工業大学大学院生命理工学院, [2]名古屋大学大学院工学研究科

○嶋田直彦[1] 池内　尚[1], 村山恵司[2], 浅沼浩之[2], 丸山　厚[1]

2C-15　コラーゲンゲルへのOVA分泌ペプチドの添加がゲル物性や細胞接着性に与える影響

[1]大阪府立大学工学研究科, [2]京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
○児島千恵[1], 中嶌悠介[1], 成田侑祐里[2], 森本直也[2], 外川大起[2], 和久友則[2], 田中直毅[2]

D会場（5F　502号室）　午前

9：00〜10：30　循環器、歯科口腔外科（合成高分子）　I / II

座長：新留琢郎（熊本大学）・馬原　淳（国立循環器病研究センター研究所）

2D-01　**脱細胞化血管の内腔表面形状を有するPDMSレプリカの創製**

[1]東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, [2]大阪工業大学 工学部 生命工学科, [3]芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科

○木村　剛[1], 近藤真由香[1], 橋本良秀[1], 藤里俊哉[2], 中村奈緒子[3], 岸田晶夫[1]

2D-02　**Improved endothelization of anti-platelet medical ePTFE by peptide immobilization**

国立循環器病研究センター研究所生体医工学部

○Liu Yihua, Maria Chiara Munisso, 馬原　淳, 神戸裕介, 山岡哲二

2D-03　**抗血小板粘着と血管内皮細胞に対する親和性向上を同時に付与する脱細胞血管修飾剤**

[1]国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部, [2]関西大学化学生命工学部

○古島健太郎[1,2], 馬原　淳[1], 平野義明[2], 山岡哲二[1]

2D-04　**生体吸収性材料に対する表面機能化コーティングとしてのシルクフィブロインの可能性**

[1]熊本大学大学院先端科学研究部, [2]日本医療機器技研, [3]東京農工大学大学院工学研究科

○徐　薇[1], 佐々木誠[2], 朝倉哲郎[3], 新留琢郎[1]

2D-05　**二酸化炭素選択透過性と生体物質非応答性をもつ高分子複合素材の開発と人工肺への応用**

[1]富山大学大学院理工学教育部, [2]富山大学大学院生命融合科学教育部, [3]北陸先端科学技術大学院大学物質科学領域, [4]福井大学大学院工学研究科

○茂木龍一[1], 西田未来[1], 中路　正[1,2], 松村和明[3], 阪口壽一[4], 橋本　保[4]

2D-06　**血液透析代替システムの実現に向けた超吸水性ナノファイバーの開発**

[1]東京理科大学大学院　基礎工学研究科, [2]物質・材料研究機構（NIMS）国際ナノアーキテクトニクス研究拠点（MANA), [3]筑波大学大学院数理物質科学研究科

○柘植美礼[1,2], 栗本理央[2,3], 菊池明彦[1], 荏原充宏[1,2,3]

10：30〜11：45　整形外科（金属・セラミック）　I / II

座長：石本卓也（大阪大学）

2D-07　**Srイオン徐放能を付与した積層造形チタン合金の生体活性評価**

[1]京都大学整形外科講座, [2]中部大学生命健康科学部生命科学科, [3]大阪冶金興業株式会社

○清水　優[1], 藤林俊介[1], 山口誠二[2], 森　重雄[3], 北垣　壽[3], 林　信実[1], 正本一誉[1], 川田交俊[1], 森實一晃[1], 奥津弥一郎[1], 清水孝彬[1], 河井利之[1], 大槻文吾[1], 後藤公志[1], 松田秀一[1]

2D-08　**水熱環境下におけるチタン基板上への層状リン酸塩の生成**

名古屋大学大学院工学研究科

○中村　仁, 金岡宏明, 鳴瀧彩絵, 大槻主税

2D-09　**イノシトールリン酸と銀イオンを利用した綿形状人工骨への抗菌性付与**

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

○相澤　守[1], 本田みちよ[1], 阿部航大[1], 横田倫啓[2], 大坂直也[3], 牧田昌士[3], 西川靖俊[3], 春日敏宏[4]

2D-10　　MC3T3-E1培養下におけるSUS316Lステンレス鋼上での酸素還元過程

大阪大学大学院 工学研究科

○宮部さやか，計田大希，藤本慎司

2D-11　　椎間板組織再生のための細胞低接着性コラーゲンゲルの開発

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

○森本康一[1]，國井沙織[1]，武岡由樹[2]，由留部崇[2]，加藤暢宏[1]，尾前　薫[3]，黒田良祐[2]

D会場（5F　502号室）　午後

14：00〜17：00　整形外科（金属・セラミック）　I / II

座長：石川邦夫（九州大学）・伊藤敦夫（産業技術総合研究所）

松本卓也（岡山大学）

2D-12　ヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチドcellnestによるβ-TCPの骨形成能向上

[1]富士フイルム株式会社　バイオサイエンス＆テクノロジー開発センター,

[2]富士フイルム株式会社　医薬品・ヘルスケア研究所

○武田香織[1], 岡村　愛[1], 江角将之[1], 伏見英生[1], 平塚崇浩[1], 我妻昭彦[1], 石井善雄[2], 畠賢一郎[1]

2D-13　骨粗鬆症モデルラットによるリン酸オクタカルシウムの骨組織応答性に関する研究

[1]東北大学大学院医学研究科整形外科, 東北大学大学院歯学研究科 [2]顎口腔機能創建学分野, [3]歯学イノベーションリエゾンセンター, [4]九州大学先導物質科学研究所ソフトマテリアル学際化学分野

○馬場一慈[1,2], 塩飽由香利[2,3], 穴田貴久[2,4], 濱井　瞭[2], 森　優[1], 井樋栄二[1], 鈴木　治[2]

2D-14　生体活性ガラス/ポリ乳酸複合化異方性ファイバーマットを用いた骨芽細胞の配列制御

[1]大阪大学, [2]名古屋工業大学

○李　誠鎬[1], 松垣あいら[1], 春日敏宏[2], 中野貴由[1]

2D-15　アパタイト核を用いた疎水化セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与

京都大学大学院　エネルギー科学研究科

○吉岡拓哉, 薮塚武史, 高井茂臣

2D-16　アパタイト被覆による石膏系骨補填材の溶解制御および骨伝導性評価

九州大学歯学研究院生体材料学分野

○土谷　享, 佐藤まりの, 石川邦夫

2D-17　レーザーアブレーションで成膜したCaP中の結晶性ハイドロキシアパタイト比率の評価

[1]産業技術総合研究所 電子光技術研究部門, [2]産業技術総合研究所 健康工学研究部門

○屋代英彦[1], 梅林信弘[1], 欠端雅之[1], 伊藤敦夫[2]

2D-18　アパタイト核処理によるTi-15Mo-5Zr-3Al合金へのアパタイト形成能付与

[1]京都大学大学院エネルギー科学研究科, [2]京都大学エネルギー理工学研究所

○薮塚武史[1], 城所泰孝[1], 高井茂臣[1], 八尾　健[2]

2D-19　種々の陽イオンを置換した水酸アパタイトセラミックスの作製と細胞応答性

[1]明治大学大学院理工学研究科, [2]明治大学研究・知財戦略機構

○伊東莉菜[1], 横田倫啓[2], 相澤　守[1]

2D-20　新たな生分解可能な金属マトリックス複合材料とする亜鉛ヒドロキシアパタイトの研究

熊本大学国際先端科学技術研究機構

○鄭 玉峰, 阮　立群, 高島和希

2D-21　ナノ表面構造による特異な「直交性骨基質配向化」機構

[1]大阪大学大学院工学研究科, [2]キャノンマシナリー株式会社

○松垣あいら[1], 中西陽平[1], 川原公介[2], 二宮孝文[2], 沢田博司[2], 中野貴由[1]

2D-22　水溶液中での生体吸収性マグネシウム合金の結晶性リン酸カルシウム被覆と耐食性の評価

京都大学大学院エネルギー科学研究科

○渡邉　慎，薮塚武史，高井茂臣

2D-23　ミネラル複合化リポナノカプセルを用いた硬組織修復用材料の作製

慶應義塾大学大学院理工学研究科高分子化学研究室

○多部田郁絵，福井有香，藤本啓二

E会場（5F　504+5号室）　午前

9：00〜10：30　組織工学（生体由来材料）　I / II

座長：玉田　靖（信州大学）・干場隆志（山形大学）

2E-01　**Preparation of stepwise adipogenesis-mimicking 3D ECM scaffolds and their effects on adipogenic differentiation of hMSCs**

[1]Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, [2]Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

○陳　亜州[1,2], 川添直輝[1], 陳　国平[1,2]

2E-02　**紙とマイクロファイバーの二層基材での気液界面培養による腸管上皮モデル組織の作製**

早稲田大学大学院先進理工学研究科

○長澤真理, 今任景一, 武田直也

2E-03　**弾性率と生分解性を独立して制御可能なシルクゲルの開発**

[1]国立循環器病センター研究所 生体医工学部, [2]関西大学 化学生命工学部

○溝口裕二[1,2], 神戸裕介[1], 平野義明[2], 山岡哲二[1]

2E-04　**羊毛ケラチン薄膜の作製**

大阪府立大学理学系研究科生物科学専攻

○原　正之, 森　英樹

2E-05　**凍結乾燥生体由来材料の復元及び機能化への真空加圧含浸技術の応用**

[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ニクス研究拠点, 物質・材料研究機構

○根岸　淳[1], 橋本良秀[2], 岸田晶夫[2], 舩本誠一[2,3]

2E-06　**シルクフィブロイン基材上でのiPS細胞の培養挙動**

[1]信州大学繊維学部、[2]国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部

○玉田　靖[1], 白川美徳[1], 佐々木瑞樹[1], 山岡哲二[2]

10：30〜12：00　免疫・ガン（合成高分子）　I / II

座長：田中　賢（九州大学）・山本雅哉（東北大学）

2E-07　**表面改変マクロファージによる生きたがん細胞の捕捉と消去**

[1]関西大学大学院理工学研究科, [2]関西大学化学生命工学部, [3]関西大学 ORDIST

○杉本駿介[1], 山内柊平[2], 大高晋之[3], 岩﨑泰彦[2,3]

2E-08　**血液適合性高分子材料上におけるがん細胞のBlebbing様現象と生存性の相関**

[1]九州大学大学院工学府, [2]九州大学先導物質化学研究所, [3]山形大学有機材料システム

○関田将伍[1], 荒津史裕[2], 蔡　孟諭[2], 柏崎亜樹[2], 小林慎吾[2], 田中　賢[1,2,3]

2E-09　**がん細胞のアポトーシスを誘導する細胞膜透過性レドックスリン脂質ポリマーの創製**

[1]東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻, [2]名古屋大学工学研究科生命分子工学専攻, [3]大阪大学太陽エネルギー化学研究センター

○金子真大[1], 石川聖人[2,3], 石原一彦[1], 中西周次[3],

2E-10　　骨転移がん治療を目指した骨指向性リン脂質ポリマー

[1]関西大学 ORDIST, [2]関西大学化学生命工学部, [3]松本歯大学歯学部

○大高晋之[1], 山口知己[2], 平賀　徹[3], 岩﨑泰彦[1,2]

2E-11　　ディッシュ型金属製細胞培養容器を用いたMCF-7細胞の培養

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

○竹下　遙[1], 井田雄太[2], 倉科佑太[3], 宮田昌悟[1], 竹村研治郎[1], 小茂鳥潤[1]

2E-12　　水酸化ナトリウム水溶液処理が多孔質チタニア微小球の構造と物性に及ぼす影響

[1]東北大学大学院工学研究科, [2]東北大学大学院医工学研究科

○半田祥真[1], 川下将一[2]

E会場（5F　504+5号室）　午後

14：00〜16：00　免疫・ガン（合成高分子・生体由来材料）　Ⅰ／Ⅱ

座長：大矢根綾子（産業技術総合研究所）・柿木佐知朗（関西大学）

2E-13　**白血病細胞結合ペプチドの高密度固定化表面による高効率細胞捕捉**

[1]東京大学大学院工学系研究科，[2]群馬県立小児医療センター

○吉原彬文[1]，東　倫之[1]，山田佳之[2]，高井まどか[1]

2E-14　**アレルゲン特異的な免疫治療を目指したビタミンーペプチドコンジュゲートの創製**

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

○杠　和樹[1]，吉田綾香[1]，岸村顕広[1,3]，森　健[1,2]，片山佳樹[1,2,3,4]

2E-15　**抗原修飾ヒアルロン酸の細胞取り込み及び抗原提示能の評価**

北九大院工

○森高　敦，櫻井和朗，望月慎一

2E-16　**エクソソームインプリント材料によるがん細胞由来インタクトエクソソーム認識**

[1]神戸大学大学院工学研究科，[2]安田女子大学薬学部

○竹内俊文[1]，森　貴翔[1]，高野恵里[1]，砂山博文[1,2]，北山雄己哉[1]

2E-17　**炎症環境の改善を目指したアポトーシス細胞膜模倣型ポリマーと抗炎症評価**

[1]東京理科大学大学院 基礎工学研究科，[2]物質・材料研究機構（NIMS）国際ナノアーキテクトニクス研究拠点（MANA），[3]筑波大学大学院 数理物質科学研究科

○矢野宥人[1,2]，中川泰宏[2,3]，菊池明彦[1]，荏原充宏[1,2,3]

2E-18　**放射線・温熱治療用イットリウム・ホルミウム含有ガーネット型フェライトの作製**

[1]東北大学大学院工学研究科，[2]東北大学大学院医工学研究科

○松本晋太朗[1]，小川智之[1]，　川下将一[2]

2E-19　**悪性度の異なるがんの ECM を模倣した培養基板上での抗がん剤耐性の発現機構**

[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

○干場隆志[1,2,3]

2E-20　**アポトーシス細胞の抗炎症活性を模倣した高分子材料(MPS)の開発**

[1]物質･材料研究機構 MANA，[2]筑波大学大学院数理物質科学研究科，[3]東京大学大学院工学系研究科，[4]大阪大学附属病院未来医療センター，[5]日本大学理工学部物質応用化学科，[6]東京理科大学大学院基礎工学研究科

○中川泰宏[1,2,3]，齋藤充弘[4]，青柳隆夫[5]，荏原充宏[1,2,6]

16：00〜17：00　DDS・創薬（合成高分子）　Ⅰ / Ⅱ

座長：岩﨑泰彦（関西大学）

2E-21　**水熱合成した中性子捕捉療法用ホウ酸ガドリニウムの構造**

東北大学大学院医工学研究科

○三上敬太，川下将一

2E-22　**分解後に酸性有機化合物の生成しないポリトリメチレンカーボネート誘導体の合成**

[1]奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学領域，[2]奈良先端科学技術大学院大学 研究推進機構

○網代広治[1,2]，Nalinthip Chanthaset[1]，信岡宏明[1]，前原明梨[1]

2E-23　**固相メカノケミカル反応を利用した双性イオンを有する機能性高分子の開発**

[1]岐阜薬科大学薬物送達学大講座薬品物理化学研究室，[2]松山大学薬学部薬品物理化学研究室，[3]中部学院大学人間福祉学部

○土井直樹[1]，杉山航平[1]，池上　遼[1]，笹井泰志[1]，山内行玄[2]，葛谷昌之[3]，近藤伸一[1]

2E-24　**生体組織付着型薬剤徐放材料への応用を志向した擬ポリロタキサンナノシートの創成**

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

○前田利菜，上沼駿太郎，小林諒太，河西健吾，横山英明，伊藤耕三

F会場（3F　レセプションホール）

★：優秀研究ポスター賞応募演題

循環器

1P-001★　**アセタール化PVAコーティング表面の抗血栓形成性評価**

[1]筑波大学大学院数理物質科学研究科, [2]物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点バイオ機能分野

○陳　曦[1,2], 田口哲志[1,2]

1P-002★　**Effects of alkaline treatment to silicones for biocompatible crosslinked polymer coatings**

[1]東京大学　工学系研究科　バイオエンジニアリング専攻, [2]Fuji-Systems Corporation,

○周　芳伃[1], 久代京一郎[1], 横井　涼[2], 原伸太郎[1], 磯山　隆[1], 安楽真樹[1], 高井まどか[1]

1P-003★　**心筋梗塞モデルマウスで、荷電水酸化アパタイト粒子の局所投与は梗塞領域を減少させる**

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

[3]愛知学院大学歯学部解剖学, [4]東京医科歯科大学　循環制御内科学

○千葉里沙子[1], 山添正博[2], 井原健介[2], 小室博明[1], 永井亜希子[3], 田村典子[4], 平尾見三[4], 古川哲史[2], 笹野哲郎[1]

1P-004　**高分子材料の血液適合性評価マーカの性能検証**

[1]国立医薬品食品衛生研究所, [2]東京大学, [3]早稲田大学, [4]九州大学, [5]Ig-M,

[6]LSIメディエンス, [7]化学物質評価研究機構, [8]シミックファーマサイエンス, [9]日精バイリス

○酘島由二[1], 井上祐貴[2], 鮫島　啓[3], 松橋祐輝[3], 保延慶紀[3], 福井千恵[1], 戸井田瞳[1], 野村祐介[1], 森下裕貴[1], 平井晴香[4], 小林慎吾[4], 秦　信子[5], 森下明彦[5], 財前絹子[6], 宮浦英樹[7], 橘田久美子[8], 松田仁美[9], 田中　賢[4], 岩﨑清隆[3], 石原一彦[2]

1P-005　**カチオン性疎水性ポリマーを用いたヘパリンの高分子表面への固定化**

[1]北陸先端科学技術大学院大学, [2]富山大学大学院理工学研究部,

[3]富山大学大学院生命融合科学教育部

○西村嘉純[1], 中路　正[2,3], 松村和明[1]

整形外科

1P-006★　**電気化学処理による抗菌性と硬組織適合性を両立したチタン表面の創製**

[1]東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科, [2]東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

○島袋将弥[1], 堤　祐介[2], 山田理沙[1], 蘆田茉希[2], 陳　鵬[2], 土居　壽[2], 野崎浩佑[2], 塙　隆夫[2]

1P-007★　**イノシトールリン酸を利用した多孔質水酸化アパタイトセラミックスへの亜鉛イオン固定化とその抗菌性**

明治大学大学院理工学研究科

○上田綾乃, 本田みちよ, 相澤　守

1P-008★　**三次元積層造形による連通孔をもつアルミナ多孔質焼結体の作製**

東京工業大学物質工学院材料系

○横井理史, 生駒俊之

1P-009★　スラリー埋没加熱処理によるSr含有アパタイト被膜の形成とその骨芽細胞石灰化促進効果

[1]北見工業大学大学院工学研究科バイオ環境化学専攻, [2]北見工業大学大学院工学研究科医療工学専攻, [3]北見工業大学工学部地球環境工学科

○駒井しおり[1], 平野満大[2], 大津直史[3]

1P-010★　ゼラチン粒子と硫酸カルシウムを同時添加したβーリン酸三カルシウムセメントの生体内反応

[1]明治大学, [2]グンゼ株式会社

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

1P-011　Zr-1Mo合金表面における細胞の増殖性および接着性の影響

[1]東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, [2]東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○小澤直樹[1], 陳　鵬[2], 蘆田茉希[2], 土居　壽[2], 堤　祐介[2], 塙　隆夫[2]

1P-012　ミネラル周囲の水和構造と硬組織形成への影響

[1]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, [2]九州大学先導物質化学研究所

○岡田正弘[1], ハラエミリオ[1], 田中　賢[2], 松本卓也[1]

1P-013　炭素繊維強化PEEK樹脂複合材を用いた大腿骨近位部固定ネイルの開発－臨床治験の短期成績　－

[1]大阪大学大学院医学系研究科運動器医工学治療学, [2]大阪医療センター整形外科,

[3]株式会社ビー・アイ・テック, [4]尼崎中央病院整形外科,

[5]大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科

○高嶋和磨[1], 中原一郎[2], 板東舜一[3], 田村和則[1], 中矢亮太[4], 濱田英敏[5], 安藤　渉[1], 高尾正樹[5], 菅野伸彦[1]

歯科口腔外科

1P-014★　QCM法による義歯床用金属材料への唾液糖タンパクの吸着解析

鶴見大学歯学部歯科理工学講座

○廣田正嗣, 吉田英史, 早川　徹

1P-015★　新規超弾性形状記憶合金Ti-Mo-Sn-Zrの耐食性評価

[1]東北大学大学院歯学研究科, [2]東北大学大学院医工学研究科

○布目祥子[1], 王　鋭[1,2], 横田琴音[1], 古谷真衣子[1], 金髙弘恭[1,2], 五十嵐薫[1]

1P-016★　傾斜機能型ナノハイブリッドチタンが歯髄幹細胞に及ぼす影響

愛知学院大学歯学部有床義歯学講座

○青柳敦士, 秦　正樹, 松川良平, 今西悠華, 小島規永, 尾澤昌悟, 武部　純

1P-017★　Effect of Nanoporous Titanium Doped with Nano-Silver and Coated with NAC

大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座

○Yuanyuan Yang, Zhang Honghao, 小正　聡, 吉峰茂樹, 岡崎定司

1P-018★　筋組織再生へ向けた磁気誘導タンパク質デリバリーによる脂肪由来幹細胞の分化誘導

[1]東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 顎口腔外科学分野,

[2]京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻生体機能高分子学分野

○木下直哉[1,2], 佐々木善浩[2], 河崎　陸[2], 丸川恵理子[1], 原田浩之[1], 秋吉一成[2]

1P-019★　酸化グラフェンスキャフォールドへの亜鉛担持による抗菌性の向上

[1]北海道大学大学院歯学研究院　歯周・歯内療法学教室, [2]株式会社日本触媒

○西田絵利香[1], 宮治裕史[1], 蔀佳奈子[1], 菅谷　勉[1], 小野博信[2]

1P-020★　歯科用コンポジットレジンのMPCポリマーによるin situ細菌感染予防とその物理的耐久性

[1]自治医科大学歯科口腔外科学講座, [2]東京大学大学院工学系研究科

○小山　潤[1,2], 深澤今日子[2], 井上祐貴[2], 石原一彦[2], 森　良之[1]

1P-021　マイクロファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイト顆粒の作製およびその骨再建への応用

[1]徳島大学大学院医歯薬学研究部　口腔外科学分野, [2]福岡歯科大学生体工学分野,

[3]九州大学歯学研究院生体材料学分野

○秋田和也[1], 福田直志[1], 大江　剛[1], 真野隆充[1], 都留寛治[2], 石川邦夫[3], 宮本洋二[1]

1P-022　PLAケージで被覆したOCP/Colの垂直的骨増生

東北大学大学院医工学研究科　骨再生医工学分野

○柳沢俊樹, 安田彩人, 鎌倉慎治

免疫・ガン

1P-023★　免疫原性細胞死を活用するためのがん光熱免疫療法用アジュバント

[1]早稲田大学理工学術院, [2]産業技術総合研究所　健康工学研究部門

○橋本　薫[1], 王　秀鵬[2], 安永茉由[2], 山崎淳司[1], 伊藤敦夫[2]

1P-024★　免疫賦活剤担持水酸アパタイトセラミックスの作製と免疫細胞応答性

[1]明治大学大学院理工学研究科　応用化学専攻　[2]東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子免疫学分野

○加々見早苗[1], 木造理萌子[1], 永井重徳[2], 相澤　守[1]

1P-025　生分解性インジェクタブルポリマーを用いた抗原・アジュバント徐放による免疫増強

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

○能崎優太[1], 葛谷明紀[2,3], 大矢裕一[2,3]

DDS・創薬

1P-026★　BNCTへの応用を目指したボロン酸結合ポリマーミセルの調製

[1]関西大 化学生命工, [2]関西大ORDIST, [3]関西大医工薬連携研究セ, [4]大阪医大

○梅山諒也[1], 能崎優太[2], 宮武伸一[4], 葛谷明紀[1,2,3], 大矢裕一[1,2,3]

1P-027★　細胞膜破壊能を有するアニオン性ジブロック共重合体 からなる高分子ミセルの機能

[1]東理大院基礎工, [2]Univ. Wisconsin

○後藤　健[1], 小松周平[1], 石原　量[1], Glen S. Kwon[2], 菊池明彦[1]

1P-028★　リガンド導入数制御を目指したγ-シクロデキストリン誘導体の分子設計

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

○杉浦幸作、大谷　亨

1P-029★　ポリエチレングリコール修飾ヒアルロン酸のミクロ相分離現象に基づいたタンパク質保持

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

○小田和音，安富　諒，大谷　亨

1P-030★　経肺投与DDSへの応用を目指した新奇な多孔質PLGA粒子 ～肺送達特性の評価～

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○西村真之介，村上義彦

1P-031★　細管による低侵襲な体内送達を可能とする多層構造型薬剤徐放シートの開発

[1]東北大学大学院工学研究科，[2]東北大学大学院医学系研究科

○佐藤悠人[1]，永井展裕[2]，西澤松彦[1]，阿部俊明[2]，梶　弘和[1]

1P-032★　MPCにより血中安定性向上を目指したPKCα応答型遺伝子キャリアの開発

[1]九州大学大学院システム生命科学府システム生命科学専攻, [2]九州大学未来化学創造センター　バイオテクノロジー部門, [3]九州大学分子システム科学センター　生体分子システム部門, [4]九州大学先端医療イノベーションセンター

○杉野竜成[1]，秀野智大[1]，岸村顕広[1,3]，森　健[1,2]，片山佳樹[1,2,3,4]

1P-033★　アシル化ポリロタキサンのナノ組織化挙動と疎水性薬物担体としての機能評価

東京医科歯科大学大学 生体材料工学研究所

○利根川朝人，田村篤志，由井伸彦

1P-034★　高分子ミセルの細胞内取り込みに対する水和状態の影響

[1]九州大学大学院工学府, [2]九州大学先導物質化学研究所,

[3]山形大学有機材料推進本部

○上原広貴[1]，小林慎吾[2]，田中　賢[1,2,3]

1P-035★　親水性物質の内包を可能とするPEG修飾タンパク質中空ナノ粒子の開発

[1]東京農工大学大学院工学府応用化学専攻, [2]東京農工大学大学院工学府生命工学専攻

○園瀧誠一[1]，野口恵一[2]，養王田正文[2]，村上義彦[1]

1P-036★　血中で病因物質を捕捉し，異所代謝経路へ誘導するナビゲーター分子の機能評価

[1]国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部, [2]関西大学化学生命工学部

○古屋敷賢人[1,2]，神戸裕介[1]，平野義明[2]，山岡哲二[1]

1P-037★　高機能・高品質脂質によるHER2指向リポソームの開発:膵癌へのDDSキャリアとしての応用

長崎大学 大学院 医歯薬学総合研究科

○菅　忠明，内山詩乃，三浦雄介，黒田直敬，萩森政頼，川上　茂

1P-038★　pH応答性デキストラン被覆したキトサン誘導体修飾リポソームによる抗がん剤デリバリー

大阪府立大学大学院　工学研究科

○中井志保，弓場英司，原田敦史

1P-039★　線維長の制御されたペプチドナノファイバーの作製と抗原デリバリーへの応用

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

○小枝清花，田中直毅，和久友則

1P-040★　眼病予防薬剤を内包した高分子超薄膜の調製と機能評価

[1]東海大学大学院工学研究科, [2]東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター

○坪井　亮[1]，熊坂実優[1]，金森審子[1]，横山　奨[2]，木村啓志[1,2]，岡村陽介[1,2]

1P-041★　インプランタブル細胞培養デバイスの開発

[1]東北大学大学院工学研究科, [2]東北大学大学院医学系研究科

○小島秀仁[1]，永井展裕[2]，西澤松彦[1]，阿部俊明[2]，梶　弘和[1]

1P-042★　上皮成長因子固定化金ナノ粒子のアポトーシス誘導活性における細胞内応答機構の探究

[1]物質･材料研究機構, [2]農業・食品産業技術総合研究機構, [3]神奈川大学理学部

○山本翔太[1]，岩丸祥史[2]，清水善久[1]，山口和夫[3]，中西　淳[1]

1P-043★　コウジ酸修飾カルボラン-シクロデキストリン複合体のBNCTホウ素薬剤としての評価

[1]大阪市立大学大学院工学研究科, [2]大阪府立大学BNCT研究センター,

[3]京都大学複合原子力科学研究所

○堂脇聖史[1]，松浦昂紀[1]，河崎　陸[1]，服部能英[2]，櫻井良憲[3]，増永慎一郎[3]，切畑光統[2]，長﨑　健[1]

1P-044　有機-無機ハイブリッド中空ナノ粒子のone-pot合成と肝繊維症治療への応用

[1]九州大学大学院歯学研究院, [2]名古屋大学未来材料・システム研究所

○林幸壱朗[1,2]，丸橋卓磨[2]，坂本　渉[2]，余語利信[2]

1P-045　経口投与製剤としての応用を目指した脂質複合化高分子ミセル ～形成特性・構造評価～

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○沖田一歩，村上義彦

1P-046　自発的な核内移行性を有するナノゲルの開発と核内物質輸送特性の解析

甲南大学ﾌﾛﾝﾃｨｱｻｲｴﾝｽ学部生命化学科

○長濱宏治，秋山雄大，中西健太

1P-047　イオン液体の生体適合性の向上とDDSへの応用

[1]九州大学大学院工学研究院応用化学部門, [2]九州大学次世代経皮吸収センター,

[3]九州大学未来化学創造センター

○田原義朗[1]，森田佳歩[1], Md. Raihan Chowdhury[1], Rahman Md Moshikur[1]，若林里衣[1,2]

神谷典穂[1,2,3]，後藤雅宏[1,2,3]

1P-048　超音波応答性ナノバブルを用いた水溶性薬物の脳内送達法の開発と評価

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医薬品情報学分野

○川上　茂，三浦雄介，佐藤大樹，渕上由貴，萩森政頼

1P-049　セラノスティクスを志向した多機能性キレートナノメディシンの開発

[1]筑波大学数理物質系物性・分子工学専攻, [2]筑波大学大学院人間総合科学研究科,

[3]筑波大学アイソトープ環境動態研究センター

○金　雅鷺[1]，長崎幸夫[1,2,3]

組織工学

1P-050★　DNAタグを用いた生分解性材料表面への 種々の細胞認識素子の部位特異的固定化法の開発

[1]関西大学化学生命工学部, [2]関西大学　ORDIST, [3]関西大医工薬連携研究センター

○住田啓迪[1]，能崎優太[2]，葛谷明紀[1,3]，大矢裕一[1,3]

1P-051★　パターン化培養に向けた異なる温度応答性高分子コーティングによる細胞接着温度の制御

[1]東理大院基礎工，[2]東女医大先端生命研

○知念　宙[1,2]，中山正道[2]，菊池明彦[1]，大和雅之[2]，岡野光夫[2]

1P-052★　3D足場材料としての単層β-ヘアピンペプチドハイドロゲルの設計

[1]関西大学　化学生命工学部, [2]関西大学　先端機構

○横川亮祐[1], 聶　文希[1], 柿木佐知朗[1,2], 平野義明[1,2]

1P-053★　細胞パターニング基材の開発を目的とした光応答性ポリマーフィルムの創製

[1]関西大学大学院化学生命工学部, [2]関西大学ORDIST

○東野美玲[1], 野口貴史[1], 河村暁文[1,2], 宮田隆志[1,2]

1P-054★　生分解性アルデヒド導入セルロースを用いた足場材料に関する研究

北陸先端大院マテリアル

○袁　喜達, 松村和明

1P-055★　高濃度化で発現した哺乳類コラーゲンの感熱応答挙動の解析

[1]大阪大学大学院工学研究科, [2]先端細胞制御化学（TOPPAN）共同研究講座, [3]JST さきがけ

○湯川優一[1], 中辻博貴[1,2], 入江新司[2], 松崎典弥[1,2,3]

1P-056★　β-グルカンを用いた細胞分化誘導の抑制

北九州市立大学大学院国際環・境工学研究科

○野上知徳, 櫻井和朗, 望月慎一

1P-057★　セルロースオリゴマーからなるクリスピーゲルの一段階調製と三次元細胞培養への応用

東工大物質理工

○前田　亨, 澤田敏樹, 芹澤　武

1P-058★　単層/スフェロイド培養における間葉系幹細胞の特性比較

北九州市立大学

○徳永優斗, 宮本大輔, 中澤浩二

1P-059★　表面修飾したジルコニア上における脂肪由来間葉系幹細胞の細胞挙動評価

[1]早稲田大学理工学術院, [2]産業技術総合研究所健康工学研究部門,

[3]産業技術総合研究所電子光技術研究部門

○矢野　玄[1], 橋本祥吾[1], 安永茉由[2], 廣瀬志弘[2], 欠端雅之[3], 屋代英彦[3], 山崎淳司[1], 伊藤敦夫[2]

1P-060★　Polyrotaxane surfaces for regulating osteogenic differentiation

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

○Arun Kumar Rajendran[1], 有坂慶紀[2], 由井伸彦[2], 井関祥子[1]

1P-061★　機能性分子の直交型固定によるハイドロゲル基材への細胞培養機能付与

[1]九州大学　工学研究院　応用化学部門, [2]未来化学創造センター　バイオテクノロジー部門

○濱田祐成[1], 南畑孝介[1], Wahyu Ramadhan[1], 後藤雅宏[1,2], 神谷典穂[1,2]

1P-062★　カチオン性/温度応答性ブロック共重合体高分子ブラシを用いた細胞分離技術の検討

慶應義塾大学大学院薬学研究科

○太田　歩, 長瀬健一, 金澤秀子

1P-063★　ポリ乳酸足場材料上の軟骨細胞培養及び分化の評価

[1]東京工業大学生命理工学院, [2]東京農業大学生命科学部分子生命化学科

○チュウモウチェン[1], 川村勇樹[1], 廣江綾香[2], 田口精一[2], 田川陽一[1]

1P-064★　細胞浸潤性を向上する疎水化ゼラチンゲルの創製

[1]筑波大学大学院　数理物質科学研究科, [2]物質・材料研究機構　機能性材料研究拠点　バイオ機能分野

○水野陽介[1], 田口哲志[1,2]

1P-065★　骨組織形成を指向したタンパク質ハイドロゲルに関する研究

東京工業大学生命理工学院

○山本遼太郎, 眞下泰正, 三重正和, 小畠英理

1P-066★　ヒアルロン酸を用いた網目状ナノファイバーシートの創製と非伸展接着細胞培養への応用

[1]東京薬科大学大学院生命科学研究科, [2]東京薬科大学生命科学部,

○川西隆仁[1], 久保田萌[2], 青木元秀[1], 熊田英峰[1], 梅村知也[1], 内田達也[1]

1P-067★　鎖長の異なる低分子量ポリリン酸の金属イオンによるゲル形成能と生体適合性評価

[1]東京大学大学院工学系研究科, [2]東京大学大学院医学系研究科

○大川将志[1], 伊藤大知[1,2], 太田誠一[2]

1P-068★　Preparation of bifunctional scaffolds for photothermal therapy and tissue regeneration

[1]Research Center for Functional Material, National Institute for Materials Science (NIMS), [2]G [2]DepartmentofMaterials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

○王　秀惠[1,2], 陳　国平[1,2], 川添直輝[1]

1P-069★　マイクロ流路チップを用いた外側血液網膜関門モデルの開発

[1]東北大学大学院工学研究科, [2]東北大学医学系研究科

○伊藤　竣[1], リージュンチェン[1], 永井展裕[2], 西澤松彦[1], 阿部俊明[2], 梶　弘和[1]

1P-070★　Establishment of Disease Model Using Nano-patterned Scaffold

[1]Cellular Functional Nanobiomaterials Group, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, [2]Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University

○張　佳蓉[1,2], 谷口彰良[1,2]

1P-071　異なる組成のエピガロカテキンガレート結合ゼラチンは再生骨の骨質を変化させる

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

○原　瑛紀[1], 本田義知[2], 鈴木　治[3], 田中知成[4], 松本尚之[1]

1P-072　細胞骨格タンパク質と相互作用するN-アセチルグルコサミン修飾絹フィブロインの作製

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

○後藤洋子[1], 山崎俊正[2], 伊勢裕彦[3]

1P-073　3次元培養のための磁性ナノ粒子含有ハイドロゲルの作製

東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻

徳田真由美, 森本展行, ○山本雅哉

1P-074　細胞コーティング技術を用いた三次元培養口腔歯肉・粘膜モデルの開発

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

○西山今日子[1], 岩井聡一[1], 赤木隆美[2], 明石 満[2]

1P-075　人工多能性幹細胞から誘導される神経前駆細胞を効率よく増幅するための培養基材の設計

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

○山内優佳[1,2], 平田伊佐雄[1], 谷本幸太郎[2], 加藤功一[1]

1P-076　簡便かつ効率的に単一細胞種を分画するためのシステム開発

[1]富山大学大学院理工学教育部(工学), [2]富山大学大学院生命融合科学教育部(先端ナノバイオ), [3]物質・材料研究機構, [4]日産化学（株）

○関　愛梨[1], 中路　正[1,2], 吉川千晶[3], 臼井友輝[4], 岸岡高広[4], 西野泰斗[4]

診断・計測技術

1P-077★　分子認識部位を導入した温度応答性ポリマーの設計と変性タンパク質認識挙動

[1]関西大学化学生命工学部, [2]関西大学ORDIST

○尾崎亮太[1], 河村暁文[1,2], 宮田隆志[1,2]

1P-078★　中間水を有する枝分かれポリグリセロールの中性子散乱法による水和状態解析

[1]神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻, [2]九州大学大先導物質化学研究所

○山崎 萌[1], 杉本 洋輔[1], 大谷 亨[1], 田中 賢[2]

1P-079★　金を配列制御したFe_3O_4/Au@SiO_2ナノ複合粒子の表面増強ラマン散乱による生体分子検出

東京工業大学物質理工学院材料系

○鈴木敦也, 生駒俊之

1P-080★　ＰＥＧ化金ナノ粒子を用いた高転移性がんの表面増強ラマン散乱法による細胞診断

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

○Babita Shashni[1], Yukichi Horiguchi[1], Kosuke Kurosu[1], Hitoshi Furusho[1], Yukio Nagasaki[1,3]

1P-081★　細胞外ベシクルの簡便・高感度検出のためのマイクロチップおよび検出プロトコルの検討

[1]東京理科大学大学院基礎工学研究科材料工学専攻 菊池研究室, [2]順天堂大学　医学部,
[3]理化学研究所　前田バイオ工学研究室

○片桐明日香[1], 石原　量[2], 中島忠章[1], 細川和生[3], 前田瑞夫[3], 友岡康弘[1], 菊池明彦[1]

1P-082★　表面機能化自律駆動マイクロチップを用いたがん細胞由来細胞外ベシクルの検出

[1]東京理科大学大学院基礎工学研究科材料工学専攻 菊池研究室, [2]順天堂大学 医学部,
[3]理化学研究所　前田バイオ工学研究室

○松井　崚[1], 石原　量[2], 中島忠章[1], 片桐明日香[1], 細川和生[3], 前田瑞夫[3], 友岡康弘[1], 菊池明彦[1]

1P-083　新奇連鎖移動剤を用いたタンパク質固定化用高分子のRAFT重合とゲル形成特性評価

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○森　悠太, 村上義彦

1P-084　ポストインプリンティング修飾ポリマー修飾チップによる前立腺特異抗原の高感度検出

[1]神戸大学大学院工学研究科, [2]安田女子大学薬学部

○北山雄己哉[1], 松本大樹[1], 砂山博文[1,2], 高野恵里[1], 竹内俊文[1]

1P-085　抗体の配向制御と安定性向上を実現する新規抗体固定化法の開発

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

○山添泰宗

イメージング

1P-086★　モレキュラービーコンによるアポトーシスの可視化

京都大学ウイルス･再生医科学研究所　生体材料学分野

○村田勇樹, 城潤一郎, 田畑泰彦

1P-087★　多色深部イメージングを利用した腹膜組織における遺伝子発現・核酸送達評価法の開発

[1]長崎大学大学院　医歯薬総合研究科, [2]長崎大学病院　薬剤部

○西村光洋[1], 萩森政頼[1], 三浦雄介[1], 麓伸太郎[1], 兒玉幸修[2], 佐々木均[2], 川上　茂[1]

1P-088　近赤外蛍光高分子ナノ粒子の第2の生体の窓を利用するin vivoイメージングへの応用

[1]東京理科大学基礎工学部, [2]東京理科大学イメージングフロンティアセンター

○上村真生[1,2], 吉田　萌[1], 梅澤雅和[1], 曽我公平[1,2]

1P-089　蛍光標識材料や蛍光標識型バイオセンサー等への応用を見据えた新規蛍光発光材料の開発

[1]ミヨシ油脂（株）, [2]岐阜大学

○矢下亜紀良[1], 川上隼人[1], 河合功治[1], 竹腰和馬[2], 村井利昭[2]

その他

1P-090★　体内植込み型医療デバイスコーティング材を目指した長期持続型抗菌ナノ粒子の開発

[1]近畿大学大学院生物理工学研究科, [2]奈良先端科学技術大学院大学

○石丸佳樹[1], Nalinthip Chanthaset[2], 網代広治[2], 東　慶直[1], 古薗　勉[1]

1P-091★　Tiベース合金の臨床応用実現に向けた医工学的検討

[1]東北大学歯学部歯学研究科, [2]東北大学大学院医工学研究科

○王　鋭[1,2], 横田琴音[1], 古谷真衣子[1], 金高弘恭[1,2], 菊池雅彦[1]

1P-092★　抗感染性バイオナノセラミックスの調製および抗菌メカニズムの検討

[1]近畿大学大学院生物理工学研究科, [2]（株）ソフセラ技術開発センター

○大下真璃[1], 小粥康充[2], 上向井徹[2], 東　慶直[1], 古薗　勉[1]

1P-093★　オリゴプロリン自己組織化集合膜の表面特性と機能評価

[1]関西大学大学院理工学研究科, [2]関西大学先端科学技術推進機構

○埜口友里[1], 平野義明[1,2], 柿木佐知朗[1,2]

1P-094★　フィラー/マトリックス界面に超分子結合を導入したコンポジットハイドロゲル

[1]大阪大学大学院工学研究科, [2]大阪大学大学院理学研究科

○菅原章秀[1], 麻生隆彬[1], 高島義徳[2], 原田　明[2], 宇山　浩[1]

1P-095★　芯鞘エレクトロスピニング法によるナノファイバー表面へのタンパク質掲示

[1]福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻, [2]福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構

○森山幸祐[1], 末信一朗[1,2], 藤田　聡[1,2]

1P-096★　生分解性ポリエステルの表面酸化による機能化

[1]大阪大学工学研究科, [2]Universiti Sains Malaysia

○呉　威廷[1], 浅原時泰[1], 麻生隆彬[1], K. Sudesh Kumar[2], 宇山 浩[1]

1P-097★　生体模倣ポリマーブラシの自律的構造転移に向けた原子間力顕微鏡による修飾密度の検討

[1]東京大学大学院工学系研究科, [2]お茶の水女子大学人間文化創成科学研究科

○本間健太[1], 太田裕治[2], 秋元　文[1], 吉田　亮[1]

1P-098★　表面カルボキシ化ナノセルロースを用いたECM模倣基板上での線維芽細胞の培養

九州大学大学院農学研究院環境農学部門

○畠山真由美, 一瀬博文, 北岡卓也

1P-099★　銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルムの抗バイオフィルム活性

[1]熊本大学大学院先端科学研究部, [2]ヤンゴン工科大学化学工学専攻, [3]熊本大学大学院生命科学研究部, [4]大日本塗料株式会社,

○本山奈菜[1], Kaung Kyaw[1,2], 市丸裕晃[1], 原田彩花[1], 小野勝彦[3], 津々木博康[3], 澤　智裕[3], 宮澤雄太[4], 溝口大剛[4], 新留琢郎[1]

1P-100★　表面親水性を制御したTiへのタンパク質模擬物質吸着挙動

[1]名古屋大学大学院工学研究科, [2]名古屋大学未来材料・システム研究所

○森　祐輔[1], 黒田健介[2], 興戸正純[2]

1P-101★　ナノアパタイトが心筋細胞へのトランスフェクションに与える細胞内取り込みの解明

[1]東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, [2]東京医科歯科大学生体材料工学研究所, [3]愛知学院大学歯学部

○小室博明[1], 笹野哲郎[1], 山下仁大[2], 永井亜希子[3]

1P-102　表面処理による多孔質チタンの生体活性に関する研究

大分工業高等専門学校機械工学科

○坂本裕紀

1P-103　医療用架橋PTFEの耐放射性特性に関する分子レベル解析

[1]滋慶医療科学大学院大学, [2]大阪府立大工, [3]阪大工

○齋藤　寛[1], 古田雅一[2], 松垣あいら[3], 中野貴由[3], 大石雅子[1], 岡崎正之[1,3]

1P-104　ラベル貼着剤に含まれる可塑剤成分のPVC製バッグ保存血液への移行

[1]国立医薬品食品衛生研究所, [2]日本医療研究開発機構,

○野村祐介[1], 河上強志[1], 福井千恵[1], 森下裕貴[1,2], 岡本吉弘[1], 酘島由二[1]

1P-105　温度応答型カチオン性くし型共重合体/ペプチド複合体による脂質膜形態の操作

東京工業大学 生命理工学院

○増田　造, 落合拓郎, 嶋田直彦, 丸山　厚

1P-106　フッ素含有高分子の界面水和構造とタンパク質吸着挙動

[1]九州大学 先導物質化学研究所 ソフトマテリアル学際化学分野, [2]AGC株式会社商品開発研究所,
[3]Department of Energy Conversion and Storage, Technical University of Denmark

○小口亮平[1,2], Jankova Atanasova Katja[3], 山本今日子[2], 田中　賢[1]

1P-107　ポリマーモノリスの形態制御と細胞培養基材への適用

[1]京都大学化学研究所, [2]物質・材料研究機構, [3]山形大学有機材料システム研究推進本部,
[4]山形大学フロンティア有機材料システム創成フレックス大学院, [5]富山大学大学院理工学研究部

○榊原圭太[1], 吉川千晶[2], 干場隆志[2,3,4], 中路　正[5], 辻井敬亘[1]

1P-108　標識酵素を含む各種酵素の長期安定性・高温耐熱性を高めるイオン液体の評価

ミヨシ油脂株式会社

○金子恒太郎, 河合功治

1P-109　生分解性ナノセルロースハイドロゲルの開発と細胞浸潤挙動の評価

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, 田口哲志

1P-110　生理条件で活発に線維化する魚由来コラーゲン

[1]東京都立産業技術研究センター　バイオ応用技術グループ, [2]日本電熱株式会社

○畑山博哉[1], 柚木俊二[1], 大藪淑美[1], 成田武文[1], 杉本清二[1], 小林千人[2], 門　雅莉[2]

1P-111　In vitro皮膚刺激性試験に用いる再構築ヒト表皮モデルの性能評価

国立医薬品食品衛生研究所医療機器部

○加藤玲子, 小森谷薫, 宮島敦子, 葩島由二

1P-112　細胞低接着性コラーゲンによる神経細胞の活性化と組織再生機能の検証

[1]近畿大学生物理工学部, [2]藍野大学中央研究施設,
[3]神戸医療産業都市推進機構医療イノベーション推進センター

○國井沙織[1], 兼清健志[2], 中野法彦[2], 加藤暢宏[1], 尾前　薫[3], 井出千束[2], 森本康一[1]

1P-113　細孔形成能を有する3Dプリンタ用ポリ乳酸フィラメントの開発

広島大学大学院医歯薬保健学研究科　生体材料学

○平田伊佐雄, 加藤功一

1P-114　創傷被覆材への応用を指向したシルクフィブロインの構造制御と細胞との相互作用解析

[1]奈良女子大学 生活環境学部, [2]国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部, [3]農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門, [4]信州大学 繊維学部

○橋本朋子[1], 道法志帆[1], 大槻直美[1], 佐野奈緒子[1], 山岡哲二[2], 亀田恒徳[3], 玉田　靖[4], 黒子弘道[1]

1P-115　細胞接着性ペプチド固定化リン脂質ポリマーブラシ表面における細胞接着挙動解析

東京大学大学院工学系研究科

○井上祐貴, 石原一彦

プログラム（ポスター発表）第２日：11月13日（火）

F会場（3F　レセプションホール）

★：優秀研究ポスター賞応募演題

循環器

2P-001★　**ペプチドアンカーを介したePTFE基材への細胞接着性リガンドの安定な直接固定化**

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

○西岡　悟[1], 伊井正明[2], 平野義明[1,3], 山岡哲二[4], 柿木佐知朗[1,3,4]

2P-002★　**異なる基底膜構造を有する脱細胞化血管における細胞挙動**

[1]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所, [2]大阪工業大学　生命工学科

○小林真子[1], 近藤真由香[1], 橋本良秀[1], 藤里俊哉[2], 木村　剛[1], 岸田晶夫[1]

2P-003　**機能性ペプチドを用いた3次元積層造形CCM合金の表面処理と細胞接着性の改善**

[1]山形大学大学院理工学研究科, [2]物質・材料研究機構, [3]NTTデータエンジニアリングシステムズ

○右田　聖[1], 齊藤雄太[1], 山崎智彦[2], 蘇亜拉図[3]

2P-004　**物理架橋ポリビニルアルコールを用いた自己拡張型ハイドロゲルステントの設計**

[1]東京都立産業技術研究センターバイオ応用技術グループ, [2]東京医科大学消化器内科学分野, [3]福井大学大学院工学研究科, [4]福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構

○永川栄泰[1,3,] 柚木俊二[1], 糸井隆夫[2], 土屋貴愛[2], 末信一朗[3,4], 藤田　聡[3,4]

整形外科

2P-005★　**超音波噴霧熱分解法による銀担持炭酸カルシウムの調製とその粉体性状**

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

○上田真結[1], 横田倫啓[2], 本田みちよ[1], 大坂直也[3], 牧田昌士[3], 西川靖俊[3], 春日敏宏[4], 相澤　守[1]

2P-006★　**アパタイト核処理による導電性CNT／PEEK複合材料へのアパタイト形成能付与**

[1]京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻, [2]京都大学エネルギー理工学研究所

○石崎千尋[1], 薮塚武史[1], 昼田智子[1], 福島啓斗[1], 高井茂臣[1], 八尾　健[2]

2P-007★　**第4級アンモニウム基を有するポリマーのグラフト化によるPEEK表面への殺菌性付与**

[1]東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻, [2]国立研究開発法人理化学研究所

○大愛景子[1], 井上祐貴[1], 中尾愛子[2], 石原一彦[1]

2P-008★　**ハイドロキシアパタイトとLポリ乳酸より作製した新規骨接合材のin vivo骨形成能評価**

[1]京都大学大学院医学研究科 感覚運動系外科学講座整形外科学, [2]敷波保夫研究所

○森實一晃[1], 敷波保夫[2], 藤林俊介[1], 後藤公志[1], 大槻文悟[1], 河井利之[1], 清水孝彬[1], 松田秀一[1]

2P-009　**動的細胞培養を可能とするHAp複合培養基材の創出と材料評価**

[1]近畿大学大学院生物理工学研究科, [2]大阪歯科大学中央歯学研究所, [3]大阪歯科大学口腔外科学第一講座, [4]株式会社ソフセラ,

○南浦亮介[1], 本田義知[2], 上田　衛[3], 小粥康充[4], 上向井徹[4], 古薗　勉[1]

2P-010　血管と骨形成を促進するハイドロゲル構造体の作製

[1]九州大学先導物質化学研究所ソフトマテリアル学際化学分野，[2]東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, [3]スタンフォード大学整形外科

○穴田貴久[1]，鈴木　治[2], Yunzhi Yang[3]

歯科口腔外科

2P-011★　ナノ構造析出純チタン金属表面へアメロジェニンコーティングが歯髄細胞に与える効果

[1]大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座, [2]大阪歯科大学医療保健学部

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

2P-012★　α型リン酸三カルシウム球の硬化による低結晶性ハイドロキシアパタイト多孔体の作製

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座生体材料学分野

○岸田　良, Tya Indah Arifta，石川邦夫

2P-013★　ポリロタキサンの分子可動性調節と成長因子導入による血管ネットワーク形成の促進

[1]東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科，[2]東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○兵頭克弥[1,2]，有坂慶紀[2]，山口　聰[1]，依田哲也[1]，由井伸彦[2]

2P-014★　純チタン金属表面上に析出させたナノ構造がインプラント埋入周囲歯周組織に与える影響

[1]大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座, [2]大阪大学産業科学研究所先端ハード材料研究分野

○Zeng Yuhao[1]，小正　聡[1]，尹　徳栄[1], Chen Luyuan[1]，吉峰茂樹[1]，関野　徹[2]，岡崎定司[1]

2P-015★　真空熱処理エピガロカテキンガレート結合ゼラチンの生体内分解挙動と細胞接着性の解明

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

○黄　安祺[1]，本田義知[2]，高　蓓媛[1]，田中知成[3]，馬場俊輔[1]

2P-016★　プロタミン担持リン酸カルシウムを用いた新規知覚過敏抑制材の開発

[1]明治大学理工学部, [2]鶴見大学歯学部, [3]マルハニチロ株式会社

○藤木政志[1]，早川　徹[2]，山本雄嗣[2]，小泉大輔[3]，外川理絵[3]，庵原啓司[3]，相澤　守[1]，本田みちよ[1]

2P-017★　歯槽骨再生を目指した硫酸化ポリロタキサン/骨形成因子複合体の骨誘導能評価

[1]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所　有機生体材料学分野,

[2]東京医科歯科大学大学院　医歯学総合研究科　顎顔面外科学分野

○寺内正彦[1,2]，田村篤志[1]，山口　聰[2]，由井伸彦[1]

2P-018　過酸化水素処理によるチタン表面ナノ構造の制御

[1]河南科技大学材料科学与工程学院，[2]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科，[3]岡山大学工学部

○Yaming Wang [1]，岡田　正弘[2]，矢部　淳[2], Guangxin Wang[1]，尾坂明義[1,3]，松本卓也[2]

2P-019　炭酸アパタイト製骨補填材の実用化を見据えた薬事許認可取得

株式会社ジーシー

○山本克史，園田秀一，熊谷知弘

免疫・ガン

2P-020★ **L-アルギニンキャリアとしてのポリグリセロールデンドリマーの分子設計**

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

○酒元　竜, 大谷　亨

2P-021★ **グリオブラスト―マ細胞における5-ALA応答不均一性に関する検討**

[1]福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻,

[2]福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構

○米田滉平[1], 末信一朗[1,2], 藤田　聡[1,2]

2P-022★ **Silver nanoparticles affect the cellular response of tumor necrosis factor-α**

[1]Cellular Functional Nanobiomaterials Group, National Institute for Materials Science, Japan,

[2]Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan,

[3]Forensic Medicine and Toxicology Department, Faculty of Vet. Med., Mansoura Uni., Egypt

○Alaa Fehaid[1, 2, 3], Akiyoshi Taniguchi[1, 2]

2P-023 **マクロファージの生物機能に与える培養基材物性の影響**

京都大学ウイルス・再生医科学研究所生体材料科学分野

○森岡智子, 城潤一郎, 田畑泰彦

DDS・創薬

2P-024★ **がん組織環境に応答してタンパク質医薬を放出しうる多重刺激応答性ハイドロゲルの調製**

[1]東理大院基礎工, [2]阪大院工

○多湖萌野[1], 茅野英成[1], 麻生隆彬[2], 石原　量[1], 菊池明彦[1]

2P-025★ **ATP応答性ナノ集合体の調製とDDSキャリアへの展開**

[1]関西大化学生命工, [2]関西大ORDIST

○土谷　平[1], 河村暁文[1,2], 宮田隆志[1,2]

2P-026★ **ペプチド・高分子複合体による脂質膜の形態制御：共重合体のアンカリング効果**

東京工業大学生命理工学院

○竹中智香, 落合拓郎, 嶋田直彦, 丸山　厚

2P-027★ **S/O/W型アジュバントによる抗原提示細胞の活性化と抗原送達能の向上**

[1]九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門, [2]九州大学 次世代経皮吸収研究センター,

[3]九州大学 未来化学創造センター

○水野梨瑚[1], 田原義朗[1], 若林里衣[1,2], 神谷典穂[1,2,3], 後藤雅宏[1,,2,3]

2P-028★ **ヒアルロン酸被覆高分子ミセルによる肝星細胞への選択的薬物配送**

[1]関西大学化学生命工, [2]関西大学ORDIST, [3]奈良県立医科大, [4]関西大医工薬連携研究セ

○永田拓也[1], 山田莉央[1], 能崎優太[2], 鍛冶孝祐[3], 吉治仁志[3], 葛谷明紀[1,2,4], 大矢裕一[1,2,4]

2P-029★ **温度応答性高分子とカチオン性高分子の混合ブラシによる温度制御型細胞分離**

慶應義塾大学 薬学部

○若山暖乃, 長瀬健一, 金澤秀子

2P-030★　ポリアリルアミン／TiO_2ナノ粒子複合体内封リポソームの調製と超音波力学療法効果

大阪府立大学大学院工学研究科

○露谷政人，弓場英司，原田敦史

2P-031★　可逆的性質変化を起こす機能性リポソームの開発

慶應義塾大学大学院薬学研究科

○藤條　惠，根本　遼，綾野絵理，長瀬健一，米谷 芳枝，金澤秀子

2P-032★　多糖のゾル-ゲル転移を利用した温度応答性マイクロ粒子の開発

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○佐藤拓未，村上義彦

2P-033★　液晶性部位を有するケラチンナノ粒子作製と機能化

慶應義塾大学大学院理工学研究科高分子化学研究室

○伊藤　香，福井有香，藤本啓二

2P-034★　薬物徐放化技術を活用した組織修復性マクロファージの体内誘導

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

○百鳥直樹，田中隆介，田畑泰彦

2P-035★　がん細胞を標的とした高機能化タンパク質ナノ粒子によるDDSシステムの構築

東京工業大学生命理工学院

○矢渕　翼，池田裕介，眞下泰正，三重正和，小畠英理

2P-036★　卵白アルブミン分泌シグナルペプチドが形成するナノ粒子によるアミロイド線維形成抑制

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

○和田愛以，和久友則，田中直毅

2P-037★　Benzoboroxole含有ポリマーによるHVJ-E表面修飾法の開発

[1]東京工業大学 環境・社会理工学院 融合理工学系, [2]物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点, [3]筑波大学大学院 数理物質科学研究科, [4]東京理科大学大学院 基礎工学研究科, [5]東京工業大学 科学技術創生院 先導原子力研究所

○米岡修一郎[1]，中川泰宏[2,3]，荏原充宏[2,3,4]，塚原剛彦[5]

2P-038★　血清アルブミン認識空間を有する分子インプリントナノゲルの生細胞取り込み挙動

神戸大学大学院工学研究科

○早川なつき，山田託也，北山雄己哉，竹内俊文

2P-039★　EGCG-modified Nanoparticle for apotosis

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

○甘　寧，大谷　亨

2P-040　薬物徐放・組織接着材料への応用を目指したtetraPEG-高分子ミセル複合化ゲル

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○小川雅人，村上義彦

2P-041　経肺投与DDSへの応用を目指した新奇な多孔質PLGA粒子～薬物放出特性の評価～

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○高橋　勉，村上義彦

2P-042　抗がん剤含有高分子ナノ粒子-血小板ハイブリッドDDSのデザイン

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

○城潤一郎, 明石祐典, 田畑泰彦

2P-043　脂肪酸修飾SN-38位置異性体のナノ・プロドラックの作製と薬効評価

東北大学 多元物質科学研究所

○谷田恵太, 小関良卓, 笠井　均

2P-044　がん細胞選択的な治療を可能にするペプチド担持型ポリマーの開発

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

○秀野智大[1], 杉野竜成[1], 遠山聖子[1], 松本　蛍[1], 中村雄太[1], 森　健[1,2], 岸村顕広[1,2,3], 片山佳樹[1,2,3,4]

組織工学

2P-045★　PMEA系ランダム共重合体による界面構造制御と生体親和性への影響

[1]九州大学大学院工学府, [2]九州大学先導物質化学研究所, [3]山形大学有機材料システム研究推進本部

○瀬上裕斗[1], 上田智也[1], 村上大樹[1,2], 田中　賢[1,2,3]

2P-046★　Novel Biocompatible Polysaccharide-based Self-healing Slide-ring Hydrogel

神戸大学工学研究科

○趙　益成, 大谷　亨

2P-047★　組織工学用ペプチドハイドロゲルの機械的特性の向上

[1]関西大学　化学生命工学部, [2]大阪医科大学, [3]関西大ORDIST

○青山　丈[1], 奥野修大[2], 大槻周平[2], 根尾昌志[2], 柿木佐知朗[1,3] , 平野義明[1,3]

2P-048★　両親媒性糖鎖ポリマーからなる自己組織化フィルムの構築

京都大学大学院工学研究科

○中村侑介, 西村智貴, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成

2P-049★　蛍光標識法を利用した放射線架橋タンパク質ゲルの架橋構造解明

[1]群馬大学大学院, [2]量子科学技術研究開発機構

○吉田郁也[1], 木村　敦[2], 田口光正[2]

2P-050★　足場材料のマイクロ化による新規なボトムアップ組織構築法の創製

[1]大阪大学大学院工学研究科, [2]JST-さきがけ

○中　康博[1], 西　宏基[1], 松崎典弥[1,2]

2P-051★　異なる脱細胞化方法で調製したECMヒドロゲルの特性評価

[1]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所, [2]大阪工業大学　工学部　生命工学科

○門田純平[1], 橋本良秀[1], 藤里俊哉[2], 木村　剛[1], 岸田晶夫[1]

2P-052★　細胞を高分子で化学架橋したゲルの開発および細胞種がゲルの物性や機能に及ぼす影響

甲南大学フロンティアサイエンス学部

○青山星海, 長濱宏治

2P-053★　ハイブリッドスフェロイド培養法を用いたリン酸カルシウム系材料の骨再生能の評価

[1]東北大学大学院歯学研究科　[1]顎口腔機能創建学分野, [2]口腔システム補綴学分野, [3]歯学イノベーションリエゾンセンター, [4]九州大学先導物質化学研究所

○佐藤智哉[1,2], 穴田貴久[1,4], 塩飽由香利[1,3], 濱井　瞭[1], 土屋香織[1], 佐々木啓一[2], 鈴木　治[1]

2P-054★　ラット先天性顎裂モデルにおける多能性前駆細胞を播種したEGCG結合ゼラチンの骨形成

[1]大阪歯科大学口腔インプラント学講座, [2]京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル学専攻, [3]大阪歯科大学中央歯学研究所

○笹山智史[1], 原　朋也[1], 田中知成[2], 本田義知[3], 馬場俊輔[1]

2P-055★　光刺激でLCSTが変化するスピロピラン導入PNIPAmブラシ表面の創製と細胞挙動制御

早稲田大学大学院　先進理工学研究科

○渡邉里奈, 長田和歩, 今任景一, 武田直也

2P-056★　Influence of viscosity property of gelatin solution on chondrocyte functions

[1]Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, [2]Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

○Kyubae Lee[1,2], Naoki Kawazoe[1], Guoping Chen[1,2]

2P-057★　Influence of cell morphology on gene transfection into mesenchymal stem cells

[1]物質材料研究機構機能性材料研究拠点, [2]筑波大学数理物質科学研究科

○楊英俊[1,2], 王新竜[1], 川添直輝[1], 陳国平[1,2]

2P-058★　細胞接着性ペプチドをリガンドとした温度制御型細胞分離

慶應義塾大学大学院薬学研究科

○志村昌紀, 花屋賢悟, 蛭田勇樹, 長瀬健一, 金澤秀子

2P-059★　ゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞凝集体の振盪培養

[1]京都大学　ｳｲﾙｽ・再生医科学研究所　生体材料学分野, [2]東京理科大学　薬学部　薬学研究科

○新居輝樹[1,2], 牧野公子[2], 田畑泰彦[1]

2P-060★　マウス頭蓋骨初期石灰化機構を模倣した新規石灰化技術の開発

[1]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野,
[2]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野, [3]岡山大学病院矯正歯科

○国富陽介[1,3], エミリオ　サトシ　ハラ[1], 岡田正弘[1], 上岡　寛[2], 松本卓也[1]

2P-061★　ヒアルロン酸ナノファイバーシートを足場とした上皮組織細胞の三次元培養

[1]東京薬科大学生命科学部, [2]東京薬科大学大学院生命科学研究科

○久保田萌 [1], 川西隆仁 [2], 青木元秀 [2], 熊田英峰 [2], 梅村知也 [2], 内田達也 [1]

2P-062★　組織接着性を有する温度応答型生分解性インジェクタブルゲルの開発

[1]関西大化学生命工, [2]関西大ORDIST, [3]関西大医工薬研セ

○藤原壮一郎[1], 永田拓也[1], 能﨑優太[2], 葛谷明紀[1,3], 大矢裕一[1,3]

2P-063★　温度応答性パターン化基材からフィブリンゲルへの連続培養による配向神経筋組織の作製

[1]早稲田大学大学院先進理工学研究科, [2]東京女子医科大学先端生命医科学研究所

○及川富美子[1,2], 高橋宏信[2], 清水達也[2], 武田直也[1]

2P-064★　マイクロカプセル培養下での生理活性ペプチドのin situ conjugation

[1]東京大学大学院工学系研究科, [2]東京大学大学院医学系研究科

○大木悠一朗[1], 太田誠一[2], 大庭伸介[1,2], 伊藤大知[1,2]

2P-065★　毛包原基を用いた皮膚組織の作製

[1]横浜国立大学大学院工学府, [2]神奈川県産業技術研究所

○楯　芳樹[1], 景山達人[1,2], 福田淳二[1,2]

2P-066★　塗布ピン方式による微細塗布装置を用いた心筋組織の作成

[1]NTN 株式会社 商品開発研究所, [2]大阪大学大学院 生命機能研究科

○近江祥平[1,2], 山中昭浩[1], 小田淳志[1,2], 中村陽香[1], 赤木隆美[2], 明石　満[2]

2P-067　アルギン酸コンポジットを用いた三次元組織培養基材の開発

上智大学大学院　理工学研究科

○佐々木寧音, 伊澤惠子, 神澤信行

2P-068　細胞構造体の凍結保存を可能にする両性電解質高分子を用いたガラス化液の開発

[1]北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス, [2]澁谷工業株式会社

○畠山　翔[1], 寺井　渉[2], 上田浩司[2], 松村和明[1]

2P-069　無血清培養用の完全合成足場の開発とその細胞選択接着性

ＡＧＣ株式会社商品開発研究所

○朱　麗君, 山本今日子

2P-070　脂肪再生可能な吸収性埋入材料の検討

[1]京都大学 医学研究科 形成外科, [2]関西医科大学形成外科, [3]グンゼ株式会社QOL研究所

○荻野秀一[1], 森本尚樹[2], 山中浩気[1], 坂本道治[1], 坂元悠紀[3]

2P-071　アテロコラーゲン膜セルカルチャーインサートの特性評価

株式会社 高研 研究所

○東　大樹, 勢村加容子, 藤本一朗

2P-072　電気・引張変形刺激を複合的に印加するための導電性高分子を用いた柔軟な細胞培養基材

[1]慶應義塾大学 理工学部機械工学科, [2]慶應義塾大学 大学院理工学研究科

○宮田昌悟[1], 志楽英之[2]

2P-073　肝細胞シート組織からの血管新生因子分泌を誘導するための核酸送達

[1]東京女子医科大学先端生命医科学研究所, [2]梨花女子大学校薬学部

○小林　純[1], Hyukjin Lee[2], 大和雅之[1], 岡野光夫[1]

2P-074　N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子を用いた効率的な間葉系幹細胞単離技術の開発

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

○伊勢裕彦[1], 松永久美子[2], 篠原満利恵[3], 酒井康行[3]

診断・計測技術

2P-075★　診断応用への展開を志向した水溶性物質を内包可能なゲルカプセルの調製

[1]関西大学大学院理工学研究科先端高分子化学研究室, 関西大学ORDIST

○平林利香[1], 河村暁文[1,2], 宮田隆志[1,2]

2P-076★　においの分子の揮発を制御する多糖超薄膜の創製と機能評価

[1]東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, [2]東海大学工学部応用化学科,

[3]東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター

○土屋笙子[1], 松本拓也[2], 中川　篤[3], 岡村陽介[1,2,3]

2P-077★　pH Sensor via Tunable G-quadruplex Structure　on Gold Nanoparticle Surface

[1]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [2]RIKEN Cluster for Pioneering Research

○Surachada Chuaychob [1,2], Masahiro Fujita[2], Mizuo Maeda[1,2]

2P-078★　タンパク質高感度検出を可能とする分子インプリント蛍光ナノセンサ

神戸大学大学院工学研究科

○水川裕貴, 堤 克輝, 北山雄己哉, 竹内俊文

2P-079★　酵素ナノオブジェクトを用いた多機能薄膜の創製

慶應義塾大学大学院理工学研究科高分子化学研究室

○溝口昂太郎, 福井有香, 藤本啓二

2P-080★　表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた microＲＮＡの複数同時検出

[1]東理大基礎工, [2]順天堂大医, [3]東理大基礎工教養, [4]理研前田バイオ

○喜種椋一[1], 石原　量[2], 秋山好嗣[3], 猪股祥子[1], 細川和生[4], 前田瑞夫[4], 菊池明彦[1]

2P-081★　高選択・高感度センシングを指向したハイドロゲル支持プラズモニックセンサの開発

[1]大阪府立大学大学院工学研究科, [2]JSTさきがけ

○山田大空[1], 川﨑大輝[1], 井上千種,[1] 前野権一[1], 末吉健志[1], 久本秀明[1], 遠藤達郎[1,2]

2P-082　血中循環腫瘍細胞を高感度検出するためのフィルターの開発

富山県産業技術研究開発センターものづくり研究開発センター

○寺田堂彦, 大永　崇

2P-083　ポリドーパミン層を基材とした細孔表面の簡便な表面機能化

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

○堀口諭吉, 合田達郎, 宮原裕二

イメージング

2P-084★　アクリルアミドーアクリル酸共重合体ゲルを用いた組織透明化と蛍光イメージング

大阪府立大学大学院工学研究科　物質・化学系専攻　応用化学分野

○大野優太, 児島千恵, 松本章一

2P-085　がんの治療と診断を目的とした機能性高分子マテリアルの開発

[1]慶應義塾大学　理工学部, [2]神戸薬科大学

○澤田和紀[1], 甘中健登[2], 佐野紘平[2], 向　高弘[2], チッテリオダニエル[1], 蛭田勇樹[1]

2P-086　細胞標識を目指した蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドの合成

[1]東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻, [2]関西大学化学生命工学部

○大場倭利[1], 最上譲二[1], 森本展行[1], 平野義明[2], 山本雅哉[1]

その他

2P-087★　加速溶出試験を用いた金属イオン溶出・蓄積挙動の評価とアレルギー性の検討

[1]東京医科歯科大学大学院　医歯学総合研究科, [2]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所

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

2P-088★　擬似体液中へのカルサイト浸漬によって誘起された石英ガラス基板上におけるリン酸カルシウム形成

[1]立命館大学理工学研究科, [2]立命館大学理工学部

○齋藤祐幹[1], 平井　豪[2], 勝野弘康[2], 中田俊隆[2]

2P-089★　段階的折り畳み様形状回復を実現する温度応答型生分解性形状記憶ポリマー材料の作製

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

○川岸弘毅[1], 能﨑優太[2], 葛谷明紀[1,3], 大矢裕一[1,3]

2P-090★　バクテリアセルロースナノファイバーを導電性ポリマーで被覆した高含水ゲル電極の開発

大阪大学大学院工学研究科

○東垣達也, 麻生隆彬, 宇山　浩

2P-091★　低侵襲的に剥離可能な歯科材料への応用を目指した光分解性ポリロタキサン架橋剤の合成

東京医科歯科大学生体材料工学研究所 有機生体材料学分野

○三田北斗, 有坂慶紀, 田村篤志, 由井伸彦

2P-092★　血液成分との相互作用における高分子濃縮層の効果

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

○舟木健太, 青木隆史

2P-093★　ポリロタキサン/ゼラチンからなる伸縮性in situ架橋ハイドロゲルの開発

[1]東京大学大学院工学系研究科, [2]東京大学大学院医学系研究科

○中野剛志[1], 太田誠一[2], 伊藤大知[1,2]

2P-094★　酵素固定化ゲル微粒子を用いたミネラリゼーションシステムの構築

慶應義塾大学大学院理工学研究科高分子化学研究室

○小林尚裕, 福井有香, 藤本啓二

2P-095★　TiへのAg$^+$ 吸着による抗菌性付与

[1]名古屋大学大学院工学研究科, [2]名古屋大学未来材料・システム研究所, [3]北見工業大学地球環境工学科

○大脇充裕[1], 黒田健介[2], 興戸正純[2], 山口花帆[3], 大津直史[3]

2P-096★　各種抗菌ナノ粒子のアナフィラキシー様反応惹起性の評価

近畿大学大学院生物理工学研究科

○梅田晃治, 石丸佳樹, 東　慶直, 古薗　勉

2P-097★　長時間安定に細胞膜を修飾できるグラフト型ポリマーの分子設計と精密合成

東京大学大学院工学系研究科

○Yum Jongmin, 井上祐貴, 石原一彦

2P-098★　両親媒性MPCポリマーブラシ表面の疎水性相互作用がタンパク質吸着に与える影響

東京大学大学院マテリアル工学専攻

○味寺克哉, 井上祐貴, 石原一彦

2P-099　焼結条件による多孔質チタンの加工特性と評価に関する研究

[1]大分工業高等専門学校専攻科機械環境システム専攻, [2]大分工業高等専門学校　機械工学科

○岩田隆正[1], 坂本裕紀[2]

2P-100　歯科において実際に用いられるインプラントの作製と評価に関する研究

[1]大分工業高等専門学校専攻科機械環境システム工学専攻, [2]大分工業高等専門学校機械工学科

○佐藤諒弥[1], 坂本裕紀[2]

2P-101　Au-Nb合金へのTi, Zr添加による磁化率、硬さへの影響

[1]徳島大学大学院生体材料工学分野, [2]徳島大学大学院歯科放射線学分野

○宇山恵美[1], 誉田栄一[2], 浜田賢一[1]

2P-102　細胞カプセル素材の開発

味の素株式会社イノベーション研究所

○大角幸治, 藤井友博, 岡松順子, 北原吉朗

2P-103　血管内皮細胞増殖因子捕捉型RNAアプタマー修飾材料の性能評価

[1]国立医薬品食品衛生研究所, [2]株式会社リボミック, [3]東京大学医科学研究所

○森下裕貴[1], 野村祐介[1], 福井千恵[1], 中村義一[2,3], 酒島由二[1]

2P-104　コアーシェル型の新しい抗血栓性材料の合成と評価

[1]山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻, [2]九州大学先導物質化学研究所

○佐藤力哉[1], 阿部雅大[1], 菅沢杏子[1], 菅原なつみ[1], 田中　賢[2]

2P-105　空気非接触/拍動循環型閉鎖系回路による高分子材料の血液適合性評価

[1]国立医薬品食品衛生研究所医療機器部, [2]日本医療研究開発機構, [3]東京大学大学院工学系研究科, [4]早稲田大学理工学術院先進理工学研究科, [5]九州大学先導物質化学研究所

○宮島敦子[1], 小森谷薫[1], 比留間瞳[1], 野村祐介[1], 森下裕貴[1,2], 加藤玲子[1], 井上祐貴[3], 鮫島啓,[4] 松橋祐輝[4], 青山祐介[4], 熊谷直紀[4], 保延慶紀[4], 頼卓然[4], 平井晴香[5], 小林慎吾[5], 田中　賢[5], 岩﨑清隆[4], 石原一彦[3], 酒島由二[1]

2P-106　フロキュレーションによるセルロースナノファイバーと細胞の自己組織化

[1]物質・材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点, [2]山形大学有機材料システム研究推進本部, [3]京都大学化学研究所

○吉川千晶[1], 干場隆志[2], 榊原圭太[3], 辻井敬亘[3]

2P-107　可逆的相互作用を用いた細胞移植ハイドロゲルの作製

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

○穴水美菜, 田畑泰彦

2P-108　破骨細胞・骨芽細胞活性を制御するリン酸化ナノセルロースからなる人工骨の開発

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, 田口哲志

2P-109　SDS-PAGEを用いた材料表面上へのタンパク質吸着挙動解析

[1]北見工業大学 医療材料研究室, [2]名古屋大学 材料表界面工学研究グループ

○川上拓野[1], 庄司拓巳[1], 黒田健介[2], 大津直史[1]

2P-110　非一様弾性場・非定住培養による間葉系幹細胞の品質保持

[1]九州大学 先導物質化学研究所, [2]国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部
○森山幸祐[1], 久保木タッサニーヤー[1], 澤田留美[2], 辻ゆきえ[1], 江端宏之[1], 佐々木沙織[1], 山本安希[1], 田中和沙[2], 河野　健[2], 木戸秋悟[1]

2P-111　異種脱細胞骨格を用いた気管移植における脂肪幹細胞の有用性

長崎大学大学院医歯薬総合研究科 腫瘍外科学分野
○久永　真, 土谷智史, 石井光寿, 溝口　聡, 福田明子, 小畑智裕, 濱崎景子, 松本桂太郎, 永安　武

2P-112　ケアダイン　シールドによる象牙質の再石灰化について

株式会社ジーシー
○吉満亮介, 熊谷知弘

2P-113　カラーコンタクトレンズの摩擦特性に関する予備的検討

[1]国立医薬品食品衛生研究所医療機器部, [2]東邦大学大学院医学系研究科　眼科学講座, [3]北里大学　医療衛生学部　医療工学科　臨床工学専攻, [4]株式会社シード　研究開発部
○中岡竜介[1], 岩下紘子[1], 堀　裕一[2], 馬渕清資[3], 酒井利奈[3], 氏平政伸[3], 松永　透[4], 酡島由二[1]

2P-114　光誘起型架橋ポリマーによる高分子多孔体の表面機能化

東京大学大学院工学系研究科
○深澤今日子, Sheng-Han Chen, 石原一彦

【日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流AWARD】

2P-115 **Large-scale preparation of hair follicle germs for hair regenerative medicine**

[1]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, [2]Faculty of Engineering, Yokohama National University,

Tatsuto Kageyama[1,2], Junji Fukuda[1,2*]

2P-116 **Development of Functional Nanoparticles for the Detection of Bacteria**

[1]Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University, [2]Current affiliation: Bioengineering Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN

Yuji Tsuchido[1,2] Aya Kitamura[1], Yuna Kasai[1], Hiroyuki Kobayashi[1], Takeshi Hashimoto1, and Takashi Hayashita[1*]

2P-117 **Fabrication of Intracellular ATP-responsive Polyion Complex Micelles for Smart Nucleotide Therapeutics Delivery**

[1]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, [2]Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, [3]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [4]Policy Alternatives Research Institute, The University of Tokyo, [5]Innovation Center of NanoMedicine, Kawasaki Institute of Industrial Promotion

Mitsuru Naito[1], Naoto Yoshinaga[2], Takehiko Ishii[2], Akira Matsumoto[3], Yuji Miyahara[3], Kanjiro Miyata[2], Kazunori Kataoka[4,5*]

予稿集

口 頭 発 表

第 1 日: 11 月 12 日（月）

Advanced design of hydrogel matrices for tissue regeneration

Division of Polymer Chemistry, Department of Chemistry – Ångström Laboratory, Box 538, Uppsala University, Uppsala, Sweden
Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo
Jons Hilborn [1]

Introduction
Until recently, the ECM has often referred to by enigmatic terms such as "ground substance". However, the ECM has recently received considerable attention due to its importance in cell-cell signaling, wound repair, cell adhesion and tissue function. New mechanisms of cell adhesion with the ECM are found with considerable frequency, but all seem to involve cell-surface receptors for molecules that are found in the space surrounding the cell (pericellular matrix) which, in turn, interact with molecules in the territorial matrix. Thus, the matrix not only exposes stores and sequesters specific molecules but can also exert a physical force on the cell and supply feedback which is undoubted of importance in controlling the tissues shape.
The importance of the information built into the extracellular matrix (ECM) cannot be overstated. Disruptions of ECM can lead to uncontrolled cell growth, and the developmental destruction of ECM during amphibian molting leads to tissue death. Integration of components of the ECM with cell surface receptors and the consequent transduction of signals across the cell membrane serve to alter cell behaviour and developmental fate. Even the intracellular signaling pathways associated with ECM components and their cognate receptors are conserved. Therefore, it is not surprising that acellular human and animal tissues are frequently and successfully employed as scaffold materials in research.

Experimental
We set out to engineer the ECM based hydrogels to incorporate growth factors and have translated those to the clinic. Furthermore, similarly, materials for cornea has become a recent focus. Hyaluronan (HA) was derivatized with complementary reactive functionalities of hydrazide and aldehyde to give hydrogels upon mixing. Collagen was crosslinked with DMTMM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride). BMP-2 was purchased from Wyeth.

Results
We could demonstrate regeneration of bone in animals and in humans using the HA with BMP-2, but with associated tissue swelling. Also, new collagen based materials aimed for corneal regeneration with strength allowing suturing have been demonstrated.

Advanced design of hydrogel matrices for tissue regeneration
Jons Hilborn
Division of Polymer Chemistry, Department of Chemistry – Ångström Laboratory, Box 538, Uppsala University, Uppsala, Sweden

1A-IL1

骨コラーゲン／アパタイト結晶配向性の定量的解析と骨再生機構解明

大阪大学 大学院工学研究科 マテリアル生産科学専攻 生体材料学領域
石本　卓也

骨基質は主に、コラーゲン線維とアパタイトナノ結晶子からなり、正常な石灰化においてはコラーゲン線維をテンプレートとしてアパタイトナノ結晶子がその結晶学的 *c* 軸をコラーゲン線維方向にほぼ一致させて沈着することで、配向化ナノ複合体を形成している。コラーゲン、アパタイトはともに力学的な異方性を示し、両者がその高強度の方位を一致させて複合化していることから、骨の力学機能はコラーゲン／アパタイトの優先配向方向とその度合によって強く支配される。したがって、配向性が骨の材料としての質を評価する有力な指標となり得る [1]。

筆者はこれまで、材料工学的な手法を駆使することで、コラーゲン／アパタイトの優先配向性と力学機能の定量解析に取り組んできた。とりわけ、アパタイト配向性の基となるコラーゲン線維の優先配向方向と配向強度のμm オーダーでの定量化法を、コラーゲンの複屈折現象を用いて確立した。これにより、再生骨 [2] や疾患骨 [3,4] における骨配向性異常の組織的観点での原因を明らかにすることができた。さらに、微小域での力学機能解析のため、ナノインデンテーション法を用い、骨が時間依存的な粘弾性を発現する材料であることを考慮し、クリープ変形の影響を最小化するための負荷ー除荷プロトコルを確立した [5]。粘弾性の度合いが異なる正常骨と再生初期の幼弱骨において、最大負荷時の粘弾性の収束、ならびにヤング率の算出への影響の収束に要する正常骨、再生骨共通の保持時間を明らかとしたことで、いかなる状態の骨に対しても正確なヤング率解析を可能とする解析条件を確立した。

こうした新たな定量解析法を駆使し、骨再生過程の解明を骨量・骨密度ではなく材料工学的観点から試みた。特に、bFGF[6] や rhBMP-2[7] の徐放を用いた組織工学による骨再生過程において、下記のような新知見を得た。(1) 骨配向性は骨密度とは独立した変化を示す、(2) 骨密度は 12 週間で正常化するのに対し配向性は完全回復までに 24 週間を要する、(3) ヤング率は骨密度ではなく配向性と強い正の相関関係を示す、(4) 再生部の配向性はリモデリングを介して再生部に負荷する応力の大きさに比例して上昇する。すなわち、骨の力学機能は配向性によって制御され、組織工学的手法は骨量増加には寄与するものの、配向性や力学機能の早期正常化に対する直接的な効果は無いことが明らかとなった。

こうした材料学的方法論は、インプラント適用後の再生骨の評価や、ひいてはインプラントの機能評価にも適用可能であり [2,8,9]、今後は、整形外科・歯科領域での活用が拡大していくと期待する。

なお、この度のバイオマテリアル科学奨励賞受賞に際しまして、これまで温かくご指導いただきました大阪大学大学院工学研究科教授 中野貴由先生、ならびに共同研究いただいた多くの先生方、学生諸氏に深く感謝いたします。

1) T. Nakano et al.: *Bone* 31 (2002) 479–487,　2) T. Ishimoto, T. Nakano et al.: *Bone* 108 (2018) 25–33, 3) T. Ishimoto, T. Nakano et al.: *Bone* 103 (2017) 216–223,　4) A. Sekita, A. Matsugaki, T. Ishimoto, T. Nakano: *J Struct Biol* 197 (2016) 260–270,　5) T. Ishimoto, T. Nakano et al.: *J Mater Sci Mater Med* 22 (2011) 969–976,　6) T. Nakano, K. Kaibara, T. Ishimoto et al.: *Bone* 51 (2012) 741–747,　7) T. Ishimoto, T. Nakano et al.: *J Bone Miner Res* 28 (2013) 1170–1179,　8) Y. Noyama, T. Nakano, T. Ishimoto et al.: *Bone* 52 (2013) 659-667,　9) S. Kuroshima, T. Nakano, T. Ishimoto et al.: *Acta Biomater* 48 (2017) 433-444.

Quantitative analyses of collagen and apatite crystallographic orientation and clarification of bone healing process

Takuya Ishimoto
Division of Materials & Manufacturing Science Graduate School of Engineering, Osaka University
Tel: +81-6-6879-7506, Fax: +81-6-6879-7506, E-mail: ishimoto@mat.eng.osaka-u.ac.jp

1A-IL2

ホストーゲスト相互作用を利用した PEG 化技術によるタンパク質の製剤特性の改善

[1]熊本大学大学院生命科学研究部，[2]熊本大学大学院先導機構
○東　大志[1,2]

1. 諸言

2017 年の世界医薬品売上ランキング top 10 のうち、6 品目がタンパク質性薬物であり、現在の医薬品のトレンドは間違いなくタンパク質性薬物である。また、高額なタンパク質製剤による医療費の高騰を勘案し、バイオシミラーも台頭してきている。しかし、タンパク質性薬物は、①物理化学的に不安定である、②血中滞留性が低い、③放出を制御する必要があるなどの問題点を有しており、医薬品開発の際の障壁となっている。本発表では、シクロデキストリン（CyD）の超分子学的性質を駆使した、タンパク質性薬物の製剤特性の改善技術について、演者らの研究を紹介する。

2. ポリ擬ロタキサン形成を利用したタンパク質性薬物の徐放化

CyD は、ポリエチレングリコール（PEG）と難水溶性の超分子複合体（ポリ擬ロタキサン）を形成することが知られている。我々は、PEG 化インスリン（PEG 分子量 2 kD）に α- および γ-CyD を添加すると、ポリ擬ロタキサン由来の沈殿を形成し、その懸濁液を皮下投与すると、投与部位でポリ擬ロタキサンが希釈され崩壊する結果、PEG 化インスリンを徐放出することを明らかにした（Fig. 1A）[1)]。

3. 活性保持型 PEG 化技術（SPRA 技術）によるタンパク質性薬物の安定化および持効化

タンパク質に PEG を化学修飾すると、安定性や血中滞留性が向上する一方で、タンパク質本来の生理活性が著しく低下する。我々は最近、β-CyD とアダマンタンの可逆的なホストーゲスト相互作用を介してインスリンを PEG 化すると、血糖降下作用が全く減弱することなく持続することを明らかにした（Fig. 1B）[2,3)]。

さらに、同様の方法で間質分解酵素のブロメラインを PEG 化し、膵臓がんモデルマウスに静脈内投与すると、ブロメラインの血中滞留性や腫瘍集積性が向上し、腫瘍周辺の間質が分解される結果、抗がん剤が腫瘍深部にまで到達可能なことが示唆された。

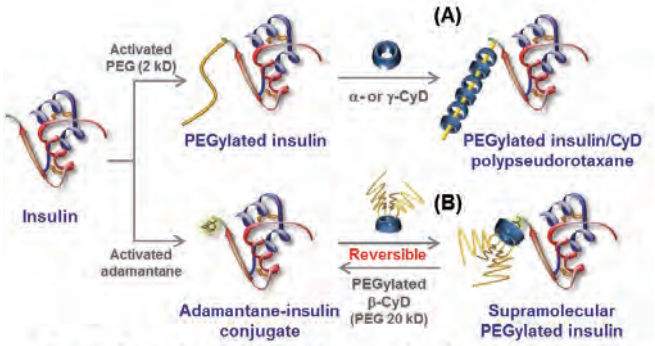


Fig. 1. Cyclodextrin-based Supramolecular Pharmaceutical Technologies for Protein Drugs

このように、CyD の超分子学的な性質を有効利用すると、タンパク質性薬物の安定性や血中滞留性などの製剤特性を顕著に改善可能なことが示唆された。現在演者は、薬学に超分子化学の概念を積極的に導入すると、新たな薬物や製剤技術が創出可能になると考え、両学問を融合した「超分子薬学」を提案している[4)]。

1) T. Higashi *et al*., ***Biomaterials***, 29, 3866-3871 (2008). 2) T. Hirotsu *et al.*, ***Mol. Pharm.***, 14, 368-376 (2017). 3) T. Hirotsu *et al.*, ***Carbohydr. Polym***., 15, 42-48 (2017). 4) T. Higashi *et al*. ***Chem. Pharm. Bull***., 66, 207-216 (2018).

Improvement of Pharmaceutical Properties of Protein Drugs through PEGylation via Host-guest Interaction

Taishi Higashi[1,2]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University
[2]Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University
Tel: +81-96-371-4168, Fax: +81-96-371-4420, E-mail: higashit@kumamoto-u.ac.jp

脱細胞化組織の *in vivo* 評価　－許容される ECM の変化 －

国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部
山岡　哲二

スキャホールドのみを用いた（細胞を使わない）再生医療は、歯周組織再生、神経誘導管、骨再生、皮膚再生などを中心に精力的に報告されている。

スキャホールの特性として、「生体に近い」＝「高機能・高性能」という気がするので、ヒトや動物の組織から免疫原性の主たる原因である細胞成分を除去した脱細胞化組織は極めて魅力的である。現在、欧米を中心に、心臓弁、血管、真皮、末梢神経など、さまざまなヒト由来脱細胞化組織が販売されている。脱細胞化組織の大きなメリットは、生体内で分解されて時間とともにレシピエントの組織と置き換わる“可能性”である、その結果レシピエントの成長に追随できるかもしれない。素晴らしい可能性であるが、ほとんど実証されていない。さて、米国で実用化されている脱細胞組織は、本当に生体に近いから実用化までたどり着いたのだろうか。はたして、脱細胞組織は本当の組織に近いのだろうか？

組織を脱細胞化する際に重要と考えられるポイントは、①細胞残渣をできるだけ完全に取り除いて免疫原性・炎症誘発生を抑制すること、および、②移植後に細胞や組織が浸潤しやすいように、細胞外マトリックスタンパクの変性を避けて構造を維持することであるが、これらを両立させることは容易ではない。生地を傷めずにシャツについたカレーのシミを抜くようなもので、シミを抜けば抜くほど生地が傷むので、どこかで折り合いをつける必要がある。

タンパク変性を誘導する界面活性剤は望ましくないので、凍結融解や電気泳動などの脱細胞手法も提案され、我々は圧力を１ステップとした脱細胞化を検討しているが、結論から言うと、いずれの方法でも細胞外マトリックスは変化（おそらく“変性”）する。この変化は、力学特製を変化させ、炎症反応を誘導し、組織再生を抑制する可能性が高い。しかしながら、実際には、脱細胞化組織としてレシピエント組織を再生するために、許容される程度の変化であれば問題ない。また、その変化が、望ましい変化である場合もある。「生体に近い」＝「高機能・高性能」というほど単純ではない。これを判断・予測できる細胞モデルや小動物モデルがあれば良いが、なかなか妥当な情報を得ることは困難である。

我々は、できるだけ変化の少ない条件で脱細胞化を施して内径 2㎜ の脱細胞化小口径人工血管を作成したが、ミニブタモデルで全例閉塞という結果となった。コラーゲンを主成分とする脱細胞化血管は、強く血栓形成を誘導する。すなわち、海外で販売されているような、大口径血管では、コラーゲンの内腔への露出は許容されるが、小口径血管では許容されないということである。そこで、実際の組織とは違う構造を持ち込み、逆に変化を大きくすることで 2㎜ の血管の開存化に成功した。喜ぶんだのもつかの間、この脱細胞小口径血管の調整法は内径 0.5 ㎜の超小口径血管では許容されず、ECM の構造的変化が開存率を低下させているためと考えられた。

「脱細胞化組織は組織から細胞成分を取り除いたスキャホールドである」というのは、あまりに一面的な見方であり、それ以外にも多くのことが変化している。最大の違いは、脱細胞組織はもう生存していない。この大きな変化が許容されるかどうか、ヒトに近いモデルで一つ一つ検証するしかないと考えて、検討を続けている。

***In vivo* evaluation of acellular tissue: Acceptable denaturation of ECM**

Tetsuji Yamaoka[1]
[1]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
Tel: +81-6-6833-5012(ex.2637), Fax: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

1A-S1-2

人工骨と骨再生　ー　研究と実用化の動向

[1]大阪大学医学部附属病院未来医療開発部未来医療センター，[2] 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科），[3]大阪大学理事・副学長
○名井　陽[1, 2]、吉川秀樹二[2, 3]

優れた骨組織親和性を示す種々のバイオマテリアルを用いた人工骨が臨床応用され，なかでもリン酸カルシウム系セラミックスの人工骨は自家骨移植に代わり，広く臨床で利用されている．これまで人工骨はマテリアル，硬化性骨ペースト，マクロ気孔構造，配向性，密度分布などの高次構造，カスタムデザイン，有機・無機ハイブリッドマテリアルなどの多彩な工夫がなされた製品が開発され，低侵襲・低合併症，簡便性という点では従来の自家骨移植に比べ患者 QOL を著しく改善し，臨床での有用性も向上してきた．その結果，現在では骨移植機会の 40%で自家骨移植に代わり，人工骨が使用されるまでになったが，現在もなお侵襲の大きい自家骨移植が多くの手術で行われており，このことは人工骨の性能が臨床現場で求められている性能に到達していないことを意味する．これは人工骨で使われているバイオマテリアルが，自家骨と同等以上の骨形成能・骨誘導能は持たないと考えられていることが最も大きな要因であり，治療効果・治療期間の点で必ずしも満足のいく性能を発揮できていないのが実情である．そのため，いまもなお新たな高骨形成活性マテリアルの実用化に期待が寄せられている．

一方，巨大な骨欠損や分節型骨欠損の修復はいまだ困難であり，このような難治性の骨病変の治療においては，組織工学・再生医療の技術に対する期待も大きい．多孔質セラミックスをはじめとする人工骨は，その構造や物性から骨再生医療のスキャフォールドとして有用と考えられており，これまでも各種幹細胞や強い骨誘導活性を持つ生理活性物質，遺伝子などを併用する研究が盛んにおこなわれてきた．さらに，米国では，すでにコラーゲンや人工骨などの材料を足場として用いて BMP-2 や同種間葉系幹細胞が臨床使用可能となっている．我が国においても多数の骨再生に関する研究が行われてきたが，治療としての臨床使用ができる段階には至っていない．このような人工骨を足場として，種々の技術を応用した再生医療研究およびその臨床応用の現状について紹介する．

Artificial Bone and Bone Regeneration: Current Status in Research and Development

Akira Myoui[1, 2], Hideki Yoshikawa[2, 3]
[1]Medical Center for Translational Research, Department of Medical Innovation, Osaka University Hospital, [2]EDepartment of Orthopaedics, Osaka University Graduate School of Medicine, [3]Executive Director, Vice President, Osaka University.
Tel: +81-6-6210-8289, Fax: +81-6-6210-8301, E-mail: myoi@hp-mctr.med.osaka-u.ac.jp

1A-S1-3

高圧処理不活化母斑を用いた巨大色素性母斑に対する皮膚再生臨床研究

[1]関西医科大学形成外科学講座、[2]国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部,
○森本　尚樹[1]、光井 俊人[1]、馬原　淳[2]、山岡　哲二[2]

【緒言】
形成外科分野では全身に巨大なほくろ（色素性母斑）が存在する先天性巨大色素性母斑治療が皮膚再生治療の大きな課題となっており、重症熱傷と並んで皮膚再生治療が必要とされる疾患である。直径 20㎝以上の巨大母斑では悪性黒色腫の発生が数%で報告されており、早期の母斑切除がガイドラインでも推奨されている。巨大母斑治療のブレークスルーとして、重症熱傷にのみ保険適用されてきた自家培養表皮ジェイス®が 2016 年に先天性巨大色素性母斑にも適用拡大された。海外で巨大母斑治療に自家培養表皮に公的保険が適用となっている国はなく、この治療は本邦発の皮膚再生医療になると考えている。しかし、皮膚は表皮と真皮の二層性構造を持ち、自家培養表皮の生着には真皮が必須である。重症熱傷では同種皮膚の使用が可能だが、母斑治療には使用できない。我々は母斑患者の皮膚再生を、母斑そのものを利用して行う方法を考案し基礎研究、臨床研究を行ってきた。具体的には切除母斑に含まれる全細胞を高圧処理することで不活化（死滅処理）し、脱細胞化はせずに再移植して真皮再生を行い、表皮は自家培養表皮を用いて再建する新規治療法を開発し、臨床研究を行ってきた。
【実験・臨床研究】
200MPa、10 分間の高圧処置で細胞が死滅すること、真皮コラーゲン、血管は高圧処理で変化しないこと、表皮基底膜は 600MPa 以上で変性すること、高圧処理後に残存するメラニン色素は長期的には吸収されること、不活化皮膚は同種脱細胞化皮膚よりも吸収が少ないこと等を非臨床研究で確認した。そして、第二種再生医療等技術を用いた臨床研究を平成 28 年 2 月より開始、目標症例 10 症例の登録を完了し平成 30 年 9 月に術後 1 年の経過観察を終了した。主要エンドポイントは、自家培養表皮移植 8 週後（不活化母斑移植 12 週後）の不活化母斑及び自家培養表皮の生着、及び移植 1 年後の組織生検による母斑再発がないことの確認である。
【結果と考察】
臨床研究は現在結果解析中であるが、1 年フォロー可能であった 9 例の組織生検結果では母斑の再発はなく、高圧処理による母斑組織の不活化は確認されたと考えている。結果を解析し、先進医療申請から保険診療を目指し、先進医療相談、PMDA 相談等を行っている。本治療法は患者組織を不活化の後再移植するという新しい概念の治療法で、薬事戦略も複数考えられる治療法である。実際に、手術室内で高圧処理を行う方法、高圧処理を外部委託する方法などを臨床研究で検討した。企業と今後の展開について相談し、協力も得つつ、一歩ずつ進展しており、開発経緯を提示することで今後のバイオマテリアル開発研究の一助になればと考えている。

A Novel Treatment for Giant Congenital Melanocytic Nevi Combining Inactivated Autologous Nevus Tissue by High Hydrostatic Pressure and a Cultured Epidermal Autograft

Naoki Morimoto[1], Toshihito Mitsui[1], Atsushi Mahara[2], Tetsuji Yamaoka[2]
[1]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University
[2]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
Tel: +81-72-804-0101, Fax: +81-72-804-2031, E-mail: morimotn@hirakata.kmu.ac.jp

1A-S1-4

生体分解性素材を用いた医療デバイス開発とその現状

[1]オハイオ州立大学外科、[2]徳島大学病院　心臓血管外科、[3]グンゼ株式会社　QOL 研究所、
○黒部　裕嗣[1, 2]，奥村　早紀[3]、中山　英隆[3]、坂元　悠紀[3]、佐藤　秀樹[3]、山内　康治[3]、
松崎　雄一[1]、宮本　真嘉[1]、宮地　秀樹[1]、鈴木　昌和[3]、森田　真一郎[3]、新岡　俊治[1]

【緒言】

素材・加工技術の進歩は、多くの医療デバイスの進化に貢献し、手術手技や低侵襲治療の進化に寄与してきた。一方、多くの医療デバイスは留置後生涯体内に残存し、①生物学的成長性の欠如、②自己修復機転の欠如、③易感染性、④物理的周辺臓器の障害、⑤MRI・CT 等画像診断上の問題、⑥小口径動脈グラフトでの長期開存性不良、等が未だ課題として残り、再手術などを必要とせざるをえないなど、特に若い患者・患児では術後の QOL 低下を強いられてきた。

これら欠点を克服する手段として、1980 年代後半に Vacanti らが生体吸収性素材を鋳型とした再生医療概念を発表し、我々はデバイス開発研究を行ってきた。

【経過と現状】

まず小児先天性心疾患で施行される Fontan 手術時の TCPC 用生体吸収性血管グラフト(低圧系)を、新岡らがグンゼ社と 2000 年から国内で医師主導研究として実施し、更に 2011 年 8 月より米国で FDA 承認下に Clinical Trial を行ってきた。方法は、手術当日に患児より骨髄単核球細胞分離後、GMP 施設で Poly-glycolic acid; PGA + poly(L-lactide-co-ε-caprolactone ; P(LA/CL)製人工血管に seeding、移植している。4 例が実施済みで、術後、狭窄に対して Ballooning を必要としたものの、経過は良好である。Clinical Trial 同時に、

1. seeding 細胞が果たす役割
2. より簡便な手技での細胞分離技術開発

等について、動物実験等で検討を行い、課題克服に向けた取り組みを Parallel に行っている。このように、課題に対して bench と clinic の両方向性で行い、デバイスの早期実用化に取り組んでいる。

一方で、成人心臓血管外科領域での小口径動脈グラフトのニーズが高い。そこで動脈用グラフト開発も、これまでのノウハウを活かしながら進めてきた。当初は耐圧性能を追求し、PLLA を用いた内径 5-600μm、外径 9-1000μm、porosity 約 60%の ESD グラフトを、SCID Beige mouse 腎動脈下腹部大動脈に移植した。移植後 1 年開存性は良好で血管リモデリング組織所見も確認しえたものの、グラフト内部への細胞浸潤性は非常に悪い結果であった。そこで、P(LA/CL)・PGA 素材を用いて様々な血管を試作し、現在、小動物・大動物に移植し、その経時的な変化と問題点に動物実験を行っている。

また、小児心疾患で比較的多い心房中隔欠損(ASD)症は近年、カテーテルによる閉鎖術が、その低侵襲性より、人工心肺を用いた心停止下閉鎖手術に代わり急速に普及してきている。一方で、ナイチノールと ePTFE 不織布からなる閉鎖デバイスは、患児に生涯にわたり残り続け、その安全性や不利益点も不明確なところが多い。そこで、ASD 症に対するカテーテル治療にも生体分解性素材を用いたデバイス開発が出来ないか検討し、生体分解性ポリマー(PGA、P(LA/CL)を主材料として作製した ASD 閉鎖デバイスを試作し、大動物実験を行うまでに至っている。

【まとめ】

これまで Bench-to-Bed & Bed-to-Bench の両方行性研究をより臨床現場に近い感覚で実施してきた。米国での生体吸収性静脈グラフトの Clinical Trial の経過とそれに伴う動物実験についての経過・知見と、派生研究として芽生えてきた新たなプロジェクト経過についても報告を予定する。

Up-to-date ; Development of Biodegradable Medical Devices.

Hirotsugu Kurobe[1, 2], Saki Okumura[3], Hidetaka Nakayama[3], Yuki Sakamoto[3], Hideki Sato[3], Yasuharu Yamauchi[3], Yuichi Matsuzaki[1], Shinka Miyamoto[1], Hideki Miyachi[1], Masakazu Suzuki[3], Shinichiro Morita[3], Toshiharu Shinoka[1]

[1]Department of Surgery, Ohio State University, [2]Division of Cardiovascular surgery, Tokushima University Hospital, [3]QOL Research Center, Gunze Ltd.

Tel: +81-88-633-7581, Fax: +81-88-633-7408, E-mail: hirotsugu.kurobe@tokushima-u.ac.jp

血糖診断のための温度応答性高分子微粒子の創成

東京理科大学基礎工学部材料工学科
○菊池　明彦

【緒言】
我が国の糖尿病患者は予備軍も含めると 1000 万人近くになると報告されている。さらに、世界に目を向けると、4.2 億人の糖尿病患者がいる、と言われている。その数は年々増加しており、特に今後発展途上国で爆発的な患者数の増加が見込まれ、2045 年には世界で 6.3 億人を超えると見積もられている[1]。特に、医療機関への通院が困難な途上国において、糖尿病の一次スクリーニング法として活用しうる簡便な診断法が開発できれば、重症化する前に治療を開始できるものと考えられる。

高分子微粒子は分散・凝集の違いを視認できることから、これまでにも簡便な診断材料として実用化され、基礎研究だけでなく、臨床においても重要な診断ツールとなっている。これらの微粒子表面の機能化を通じ、種々診断材料の構築が可能になる。われわれは、原子移動ラジカル重合（ATRP）とマクロモノマー法を組み合わせ、コロナ鎖長と微粒子の粒径を制御したコア-コロナ型感温性微粒子を調製してきた[2,3]。微粒子のコロナ層に感温性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)を用い、PNIPAAm の下限臨界溶液温度(LCST)を境に分散・凝集状態が変化する感温性微粒子を調製できることを明らかにした。本研究では，感温性微粒子の最表面に糖認識部位としてフェニルボロン酸(PBA)を導入し，糖と PBA 基との相互作用により微粒子最表面の親水性の変化を利用し，糖濃度変化に応じて分散・凝集状態が変化する糖応答性診断微粒子の調製を目的にした。

【結果と考察】
NIPAAm の ATRP を行い、両末端の官能基変換により成長末端にビニル基を、開始末端に *o*-fluorophenylboronic acid (FPBA)基を、それぞれ有するテレケリック PNIPAAm を合成した。α-FPBA-ω-vinyl テレケリック PNIPAAm の酸-塩基滴定から FPBA 基の p*K*a を求め、グルコース非存在下で 7.7、グルコース 200mg/dL 存在下で 6.8 となり、生理的 pH でグルコースと結合する PNIPAAm が得られた。α-FPBA-ω-vinyl テレケリック PNIPAAm とスチレンを、水/エタノール混合溶媒中で分散共重合し、平均粒径 860 ± 100 nm の微粒子を得た。この微粒子を種々グルコース濃度の異なるリン酸緩衝生理食塩水溶液(PBS, pH 7.4, *I*=0.15)中に分散させ、温度変化にともなう微粒子の分散状態の変化を顕微鏡下で観察したところ、20°C ではグルコース濃度にかかわらず微粒子は分散状態であった。一方，25°C ではグルコース非存在下でのみ凝集し、30°C になるとグルコース 100mg/dL では凝集、200 mg/dL では分散状態となった。この結果は、FPBA とグルコースの結合に伴う平衡の移動にともなう、アニオン化した FPBA 基量が増大し PNIPAAm 鎖の脱水和を抑制した結果と考えられる。以上から、30°C では正常血糖濃度では微粒子が凝集する一方、高血糖濃度では微粒子が分散することを示しており、微粒子の分散状態の変化で血糖値の簡易診断を行いうることを示唆する。

【謝辞】
本研究の一部は、科学研究費補助金（16H03184）、カシオ科学振興財団研究協賛により実施した。本研究は、筆者が現所属に異動してから進めてきた内容であり、共同研究者、学生諸氏に深く御礼申し上げます。特に、大阪大学の麻生隆彬准教授、順天堂大学の石原量博士、松山拓矢博士、林　宏幸氏、山田剛大氏、小松周平氏、松本拓也氏、米津健太氏の研究により得られた成果であり、ここに感謝申し上げます。

[1] *IDF Diabetes Atlas, 7th ed.* Brussels, Belgium: 2015. 17th, Dec., **2017.**
[2] T. Matsuyama *et al., Langmuir,* **2013**, *29,* 15770-15777.
[3] T. Matsuyama *et al*., *Coll. Surf. B: Biointerface*s, **2014**, *123*, 75-81.

Design of thermoresponsive polymer particles for naked-eye diagnosis of blood glucose level

Akihiko Kikuchi
Department of Materials Science and Technology, Tokyo University of Science
Tel: +81-3-5876-1415, Fax: +81-3-5876-1639, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

1B-01

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, [2]Uppsala University, Department of Immunology, Genetics and Pathology, [3]Lund University Hospital Department of Transplantation, [4]Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences
○寺村裕治 [1, 2], Sana Asif[2], Alireza Biglarnia[3], Kristina Nilsson-Ekdahl[2], Marianne Jensen-Waern[4], Bo Nilsson[2]

【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 ASIF[2], Alireza BIGLARNIA[3], Kristina NILSSON-EKDAHL[2], Marianne JENSEN-WAERN[4], Bo NILSSON[2]
Department of Bioengineering, The University of Tokyo, [2]Uppsala University, Department of Immunology, Genetics and Pathology, [3]Lund University Hospital Department of Transplantation, [4]Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences
Tel: +81-03-5841-1174, E-mail: teramura@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

1B-02

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，[3]JST 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≈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)、ガラスベースディシュ(IWAKI)を用いた。ASCs をそれぞれの基材に播種(2.0×10^5 cells/φ35mm 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。

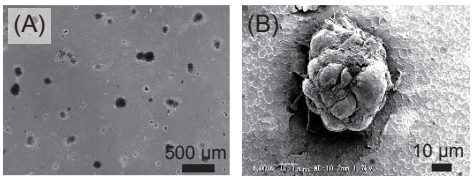


Figure 1 (A) ASCs morphology on porous nanosheet, (B) SEM image of spheroid cultured on porous nanosheet.

【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 Suematsu[1], Shinji Takeoka[1], Toshinori Fujie[2, 3]
[1]Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, [2]Waseda Institute for Advanced Study, Waseda University, [3]Japan Science and Technology Agency, PRESTO
Tel: +81-3-5369-7324, Fax: +81-3-5369-7324, E-mail: suematsu11395@toki.waseda.jp

1B-03

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®、グンゼ（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℃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℃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℃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

1B-04

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℃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気的に刺激したところ、電気刺激に応答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

1B-05

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ニクス研究拠点，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]，舩本　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復元した生理食塩水復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、生理食塩水復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、生理食塩水復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、生理食塩水復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、生理食塩水復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。

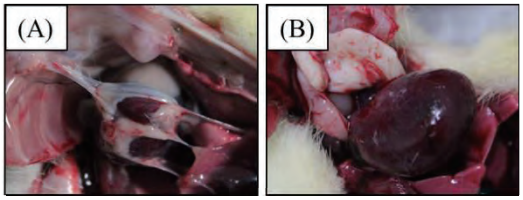


Figure 1. (A) Saline/pericardia and (B) saline/fibrin in rat models.

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、生理食塩水復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、生理食塩水復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。

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

Jun NEGISHI[1], Yoshihide HASHIMOTO[2], Yongwei ZHANG[2], Akitatsu YAMASHITA[2], Seiichi FUNAMOTO[2,3], Akio KISHIDA[2]
[1]Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University
[2]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
[3]International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science
Tel: +81-268-21-5335, Fax: +81-268-21-5331, E-mail: jnegishi@shinshu-u.ac.jp

1B-06

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 ºC 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。

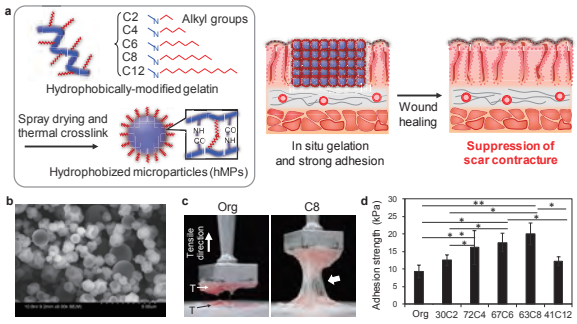


Figure 1. (a) Schematic of colloidal wound dressing composed of hydrophobically-modified gelatin particles. (b) Scanning electron microscopic image of gelatin particles. (c,d) Adhesion test of gelatin particles to gastric submucosa. **P*<0.05, ***P*<0.01 (n=4).

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).

Development of multifunctional wound healing particles toward digestive system cancer therapy

Akihiro Nishiguchi[1], Tetsushi Taguchi[1]
[1]Biomaterials 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，簗谷　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 が高値をが示し，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

1B-08

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 ºC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(Mw = 4,000と29,000)とPEG(1,000と3,350)を110 ºC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 ºCまで試料を冷却した後、5 ºC/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 ºCから20 ºC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^{1}H核のパルスNMRを用い、XRDと同様に-70 ºCから20 ºC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ミ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 *i*ntermediate Water

Masaru Nakada[1]
[1]Toray Research Center, ing.
Tel: +81-77-533-8608, Fax: +81-77-533-8696, E-mail: masaru_nakada@trc.toray.co.jp

1B-09

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、残存による骨再生阻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)の復合化により、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-Ogata[1], Tsukasa Ohno[1], Yuji Narita[1], Kei Kanie[2], Ryuji, Kato[2], Koichiro Uto[3], Mitsuhiro Ebara[3]
[1]Department of Cardiac Surgery, Graduate School of Medicine, Nagoya University
[2]Department of Basic Medicinal Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University
[3]Mechanobiology 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

1B-10

経内視鏡的に導入可能なコラーゲンゲ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ゲル（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℃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．

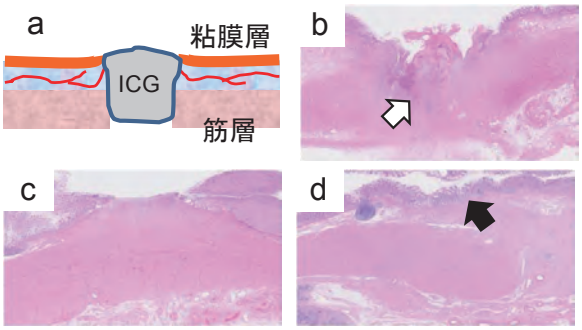


図 1 ICG で閉鎖したブタ胃穿孔の HE 染色組織像
(a) ICG で閉鎖した穿孔部縦断面の模式図，(b～d)それぞれ 1, 2, および 4 週の組織像．白矢印は ICG を，黒矢印は粘膜層を示す．

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．

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

Shunji Yunoki[1], Takefumi Narita[1], Toshio Uraoka[2]
[1]Biotechnology group, Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, [2]Department 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

1B-11

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 1㎜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 2㎜ 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 0.6㎜、長さ 5㎝）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、超高圧処理(UHP)による脱細胞化血管を、３種類の温度設定（4℃，37℃，60℃）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℃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、超高圧処理ではほとんど変化せず、SDS 処理で増加し、60℃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、そのためには超高圧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 Yamaoka[1]
[1]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
[2]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kyoto University
Tel: +81-06-6833-5012 (Ext: 2633), Fax: Fax: +81-06-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

1B-12

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。

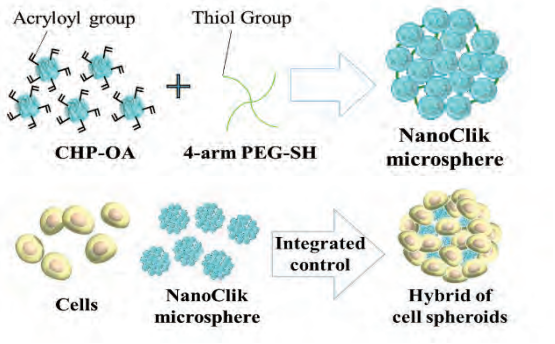


Fig.1. Schematic illustration of construction hybrid of cell spheroid

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[1]。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 150μm 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変えることで、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。

【参考論文】

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.

Hirotaka 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.hirotaka.28m @st.kyoto-u.ac.jp.

1B-13

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（μCP）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）をスピン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）上にスピン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 μm /50 μm）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 μg/cm^2; 1.5w/v%: 2.41 μg/cm^2）。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、μCP 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 Nakayama[1], Junichi Tonegawa[2], Akihiko Kikuchi[2], Masayuki Yamato[1], Teruo Okano[1]
[1]Inst. Adv. Biomed. Eng. & Sci., Tokyo Women's Med. Univ.,
[2]Dept. 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

1B-14

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。

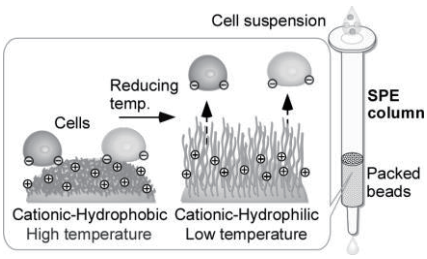


Fig.1 Temperature-responsive SPE column

【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℃でのカラムへの保持挙動、温度 4℃でのカラムからの溶出挙動を観察した。

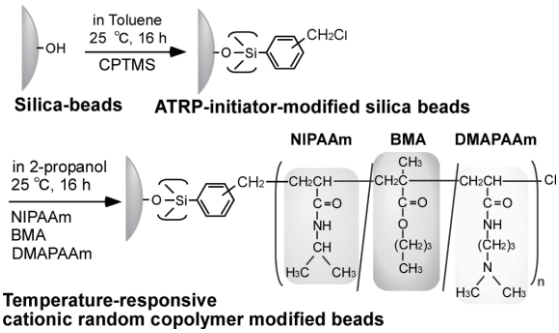


Fig.2 Preparation scheme for thermoresponsive cationic polymer brush modified beads

【結果と考察】hbmMSC を温度 37℃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℃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℃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。

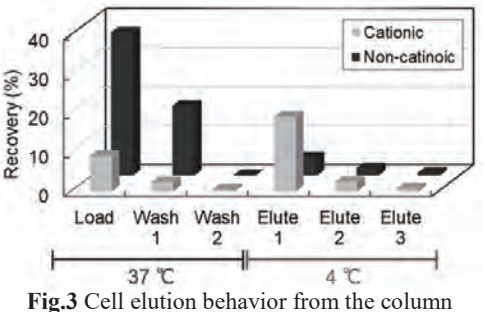


Fig.3 Cell elution behavior from the column

Development of Thermoresponsive Cell Separation Column using Solid Phase Extraction Column

Kenichi Nagase[1], Yuki Nagata[1], Daimu Inanaga[1], Goro Edatsune[1], Aya Akimoto[2], Hideko Kanazawa[1]
[1]Faculty of Pharmacy, Keio University
[2]Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo
Tel: +81-3-5400-1378, Fax: +81-3-5400-1378, E-mail: nagase-kn@pha.keio.ac.jp

1B-15

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、スピン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。

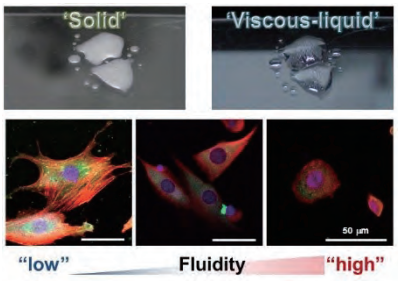


Figure 1. Photographs of P(CL-*co*-DLLA) derivatives with different matter state. Cell morphology is influenced by substrate fluidity.

[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 Uto[1], Mitsuhiro Ebara[2]
[1]International Center for Young Scientists, National Institute for Materials Science, [2]International 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

1B-16

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-1β, 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 TAMURA[1], Moe OHASHI[1], Sumio HAYAKAWA[2], Yumiko OISHI[2], Nobuhiko YUI[1]
[1]Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (TMDU). [2]Department 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

1B-17

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腔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）を中腔構造に流し，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．

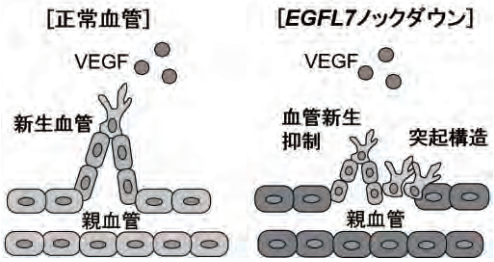


Fig. 1　EGFL7 ノックダウン血管で得られた血管新生の模式図

【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.

***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]
[1]Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, [2]Department of Bioengineering, The University of Tokyo, [3]LIMMS/CNRS-IIS UMI 2820, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, [4]CNRS/IIS/COL/Université Lille 1, SMMiL-E project, [5]Université Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161
Tel: +81-3-5452-6470, E-mail: mat@iis.u-tokyo.ac.jp

1B-18

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て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、1.6×10^2 μmol/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℃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。

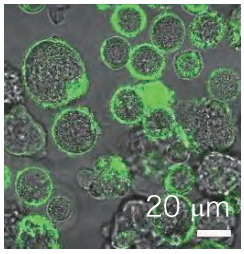


Figure 1 MSCs modified with FITC-ES-bp-PEG lipid

【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。

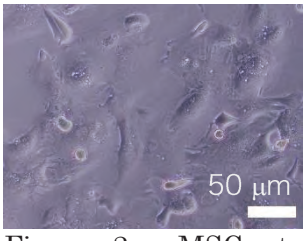


Figure 2 MSCs to adhere to E-selectin immobilized surface

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

Naoya OKADA[1], Yuuki INOUE[2], Kazuhiko ISHIHARA[2], and Yuji TERAMURA[1,3]
[1]Department of Bioengineering, The University of Tokyo, [2]Department of Material Engineering, The University of Tokyo, [3]Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Sweden
Tel: +81-03-5841-1174, E-mail: okada@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

1C-01

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。

1C-02

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。

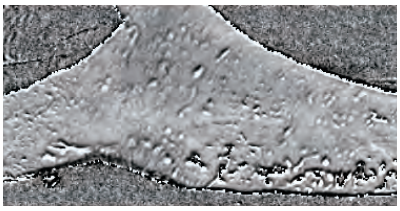


Fig.1 Femoral shaft fracture callus

【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

Hiromi KIMURA-SUDA[1,2], Teppei ITO[2], Yuya KANEHIRA[2], Tomohiro SHIMIZU[3], Ryota HARA[1], Masahiko TAKAHATA[3]
[1]Department of Applied Chemistry and Bioscience, Chitose Institute of Science and Technology
[2]Graduate School of Photonics, Chitose Institute of Science and Technology
[3]Department 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

1C-03

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、電気的刺激は、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、オゾンを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 ウエル培養用プレートに、各ウエルごとに計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℃、5%CO_2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（0.5～2.3μA）させると、増殖率は亢進した。一方、Ie を固定(1.2μA)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。

	増殖	分化
Ie（Vd:固定） ↗	↗	↗
Vd（Ie:固定） ↗	↘	↷

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 Sugimori[3], Hiroyuki Hirakawa[3], Ai Tsutsui[3], Tadashi Iwamatsu[3], Yo Uemura[2], Kenichi Morita[2], Takashi Tsumura[2]　[1]Graduate School of Engineering, Osaka University, [2]JTEC CORPORATION, [3]SHARP CORPORATION
Tel/Fax: +81-6-6879-4973, E-mail: uemura@prec.eng.osaka-u.ac.jp

1C-04

骨親和性ポリリン酸エステルと破骨細胞との相互作用

[1] 関西大学化学生命工学部, [2] 関西大学 ORDIST, [3] 東京医科歯科大学生体材料工学研究所
[4] 大阪医科大学整形外科学教室
○岩﨑 泰彦[1,2], 大高 晋之[2], 中村 美穂[3], 横田 淳司[4], 根尾 昌志[4]

【緒言】 全世界的に高齢化が進行している状況において, 骨粗鬆症の患者は, わが国でおよそ1千万人(総人口の10%弱)に達しており, 70歳を超えると約半数にその症状が認められる。一方, 厚生労働省の統計にもあるように, 現在の死亡原因の1位は癌であり, 肺癌, 乳癌, 前立腺癌の多くの患者は, 高い確率で骨転移を併発する。骨に転移した癌細胞は段階的に骨系細胞に影響をおよぼし, 骨リモデリングが破綻する。我々は、骨リモデリングの正常化に資するポリマー医薬の開発を進めており、核酸様構造を有するリン酸ジエステルポリマーが骨に対し高い親和性を有することを見出している[1)]。本研究では、骨リモデリングを担う骨系細胞のひとつである破骨細胞をリン酸ジエステルポリマーとの相互作用について調査したので報告する。

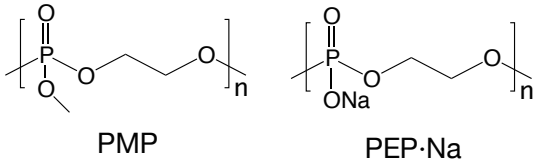


Fig. 1 Structure of polyphosphoesters

【実験】 リン酸トリエステルポリマー(PMP, Fig. 1) およびリン酸ジエステルポリマー(PEP·Na, Fig. 1)は既報に従い合成した[2)]。ヒト新鮮血より単離した末梢血単核球(PBMC)をウシ骨スライスもしくは組織培養用プレート上に 1×10^7 cells/cm^2 の密度で播種し, 分化因子としてマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF) と可溶性 NF-κB 活性化受容体リガンド(sRANKL)を含む培地内で一晩培養した。細胞が基材表面に接着していることを確認した後、同培地にポリマーの終濃度が 1 mg/mL になるように PEP·Na もしくは PMP を添加し、3日間培養した。その後、3日毎に培地を交換しながら計2週間培養を行った。分化の程度は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色および破骨細胞に特徴的なアクチンリングを蛍光観察することによって確認した。また, 破骨細胞の機能を明らかにするために、細胞培養後の骨スライスを界面活性剤の溶液に浸し細胞成分を完全に取り除いた後に, 走査型電子顕微鏡を用いてスライス表面に形成されたピット(溶解痕)を観察した。

【結果と考察】PMP および PEP·Na の数平均分子量は 1 万程度であり、いずれも水溶性であった。Fig.2 は組織培養用プレート上で2週間培養した PBMC のアクチンを蛍光免疫染色したのちに蛍光顕微鏡で観察した結果である。ポリマーを含まない培地中で培養した Native では PBMC が融合することにより生じた多核巨細胞が観察された。また、その多核巨細胞には破骨細胞の特徴でもあるアクチンリングの形成も顕著に認められた。ポリリン酸エステルの影響に着目すると、PMP を添加した群ではポリマー濃度に関係なく多核巨細胞の形成が認められたが、PEP·Na を添加した群では、PEP·Na の濃度にともない多核巨細胞の形成が抑制されることが明らかとなった。発表当日はポリマーの細胞内取り込みについても議論する予定である。

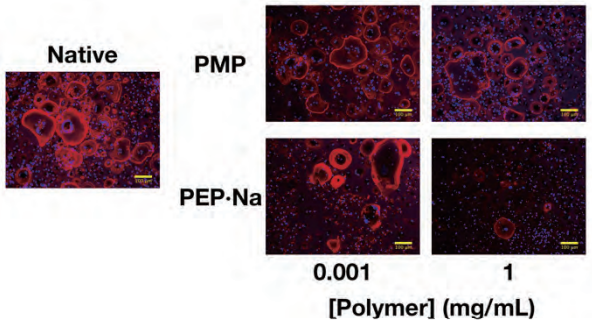


Fig. 2 Morphology of the cells adhered on a culture plate after contact with PEP·Na as visualized by fluorescent staining of actin filaments (red) and nuclei (blue). Bar=100 μm

【文献】 1) Y.Iwasaki et al., *Biomat. Sci.* **2018**;6:91. 2) S. Kootala et al., *Macromol. Biosci.* **2015**;15:1634.
【謝辞】本研究の一部は科研費(16H03185)によって行われた。

Effect of polyphosphoesters on osteoclast differentiation and function

Yasuhiko Iwasaki[1,2], Akihisa Otaka[2], Miho Nakamura[3], Atsushi Yokota[4], Masashi Neo[4]
[1]Department of Chemistry and Materials Engineering, [2]ORDIST, Kansai University
[3]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
[4]Department of Orthopedic Surgery, Osaka Medical College
Tel: +81-(0)6-6368-0090, Fax: +81-(0)6-6368-0090, E-mail: yasu.bmt@kansai-u.ac.jp

1C-05

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化移植し、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ッ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。

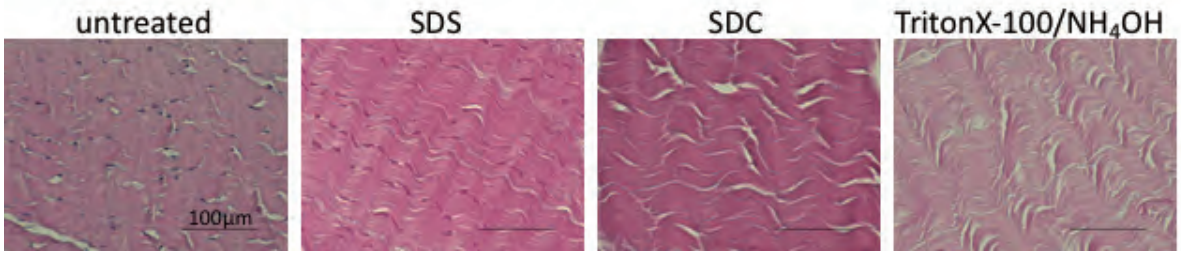


Fig. 1 Histological images of hematoxylin and eosin-stained samples.

Development of Ligament Matrix Sheet for Regeneration of Periodontal Ligament

Naoko Nakamura[1], Hiroki Harukaze[2], Ryota Ohira[1], Tsuyoshi Kimura[3], Masahiro Yamada[4], Akio Kishida[3]
[1]College of Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology
[2]Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology
[3]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
[4]Graduate School of Dentistry, Tohoku University
Tel: +81-48-720-6014, Fax: +81-48-720-6011, E-mail: naoko@shibaura-it.ac.jp

1C-06

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. Abe[1]，Aifang Han[1]，Seongjin Shin[3]，
Ji-Myung Bae[3]，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，αMEM 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ティング法で評価した．また，分化誘導した DPSC の血管内皮細胞としての機能を評価するために，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．

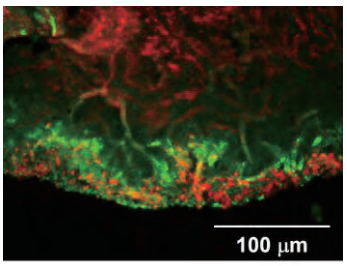


Fig. Luminal structure in DPSC construct.

【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 SASAKI[1], Chihiro KATATA[1,2], Gabriela L. ABE[1], Aifang HAN[1], Seongjin SHIN[3],
Ji-Myung BAE[3], Satoshi IMAZATO[1,4]
[1]Department of Biomaterials Science, [2]Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, [3]Department of Dental Biomaterials, College of Dentistry, Wonkwang University, [4]Department 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

1C-07

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ミクロ刺激となり、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て 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℃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℃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。

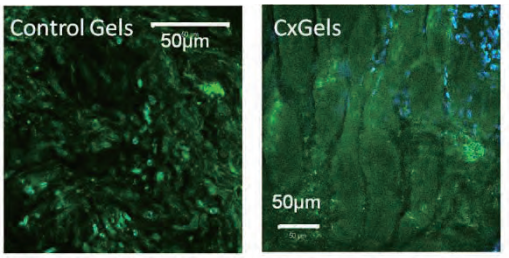


Figure 1. Lifeact-GFP 発現 C2C12 細胞を内包したアルギン酸ゲル（左）および Lifeact-GFP 発現 C2C12 細胞で作製した CxGels（右）をマウスに移植して 15 日後の各ゲルの共焦点顕微鏡画像．緑：Lifeact-GFP，青：Hoechst.

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

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

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

1C-08

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、CO_2 インキュベータ（37℃）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。

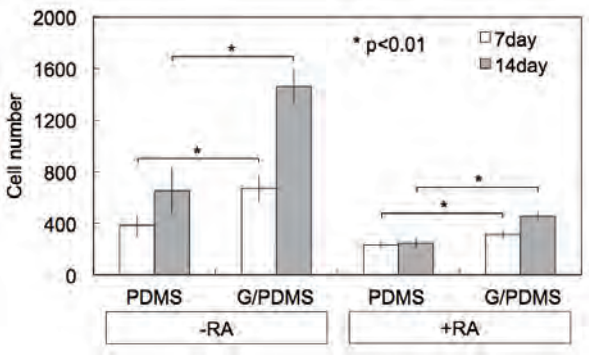


Fig.1 Cell number measurement results

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 Shimoda[2], Masatou Ishihara [3], Yuki Okikawa[3], Masataka Hasegawa[3]
[1]Department of Applied Chemistry, Nippon Institute of Technology
[2]Department of Innovative Systems Engineering, Nippon Institute of Technology
[3]Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Tel: +81-480-33-7724, E-mail: ban@nit.ac.jp

1C-09

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。

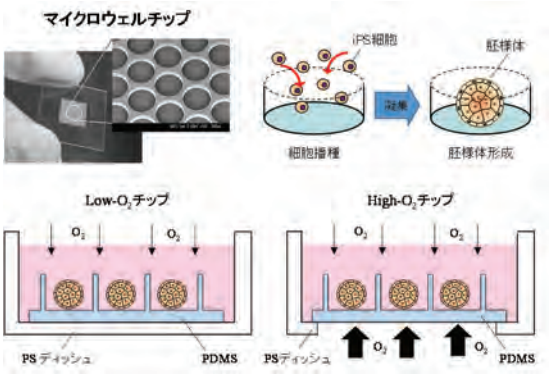


図 1.マイクロウェルチップにおける酸素供給の概念

【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 μm 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 チップでは低酸素境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

1C-10

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砕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】

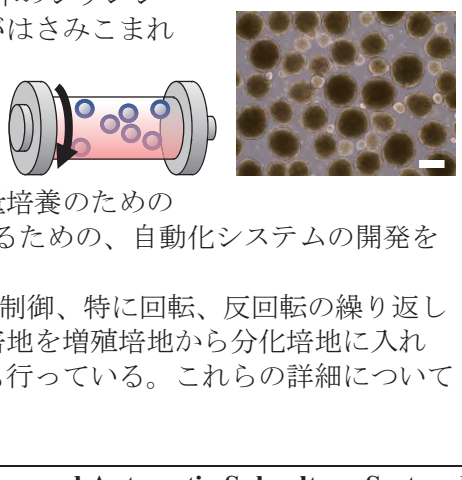
再生医療、創薬分野での iPS 細胞の応用が期待されているが、実際の医療行為や創薬スクリーニングを考えた場合、10^8～10^{10} 個オーダーの細胞数が必要と考えられており、その実現や産業応用には通常のディッシュを用いた２次元培養では限界があり、種々の３次元培養の開発が試みられている。我々は、円筒シリンジ状のベッセル（図（左））を、軸を水平方向に回転し、細胞、細胞塊を浮遊培養させることによる３次元培養法（CellFloat）の開発を進めており、軟骨構築等への応用を推進する一方、iPS 細胞などのスフェロイド培養への応用展開を進めている。iPS 細胞のスフェロイド培養においては、一定以上の大きさに育った iPS スフェロイドは分化がおこりやすく、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;10μM)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砕は、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、物理的粉砕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 100～200μm）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 5～８rpm で、３日間で増殖率 3～4.5 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（70μm）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砕した。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 Jin[2], Mari Wakabayashi[2], Yo Uemura[2], Kenichi Morita[2], Takashi Tsumura[2]
[1]Graduate School of Engineering, Osaka University　[2]JTEC CORPORATION
Tel/Fax: +81-6-6879-4973, E-mail: uemura@prec.eng.osaka-u.ac.jp

1C-11

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の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。

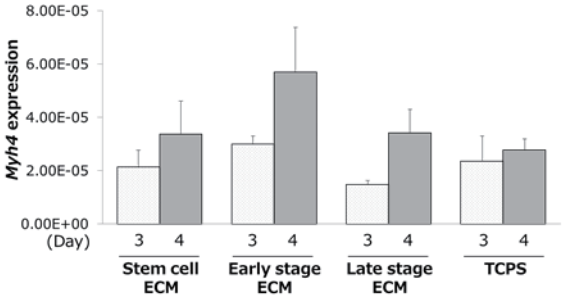


図:マトリックス上でのMHCの発現

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。

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

Takashi Hoshiba[1,2,3], Natsumi Yokoyama[4]
[1]Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, [2]iFront, Yamagata University, [3]National Institute for Materials Science, [4]Yamagata Prefectural Yonezawa Kojokan High School
Tel: +81-238-26-3585, E-mail: thoshiba@yz.yamagata-u.ac.jp

1C-12

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 Ni^{2+} ions. The immobilization is expected through the chelate linkage between NTA-Ni^{2+} 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

1C-13

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収し、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。

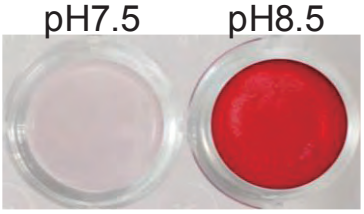


Fig.1.石灰化環境をアルカリ性に変調することにより、迅速な細胞膜ナノフラグメント石灰化が認められた。

Effect of pH environment on cell membrane nanofragment mineralization

Emilio Satoshi Hara[1], Masahiro Okada[1], Takuya matsumoto[1]
[1]Department of Biomaterials, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan. [2]Department 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

1C-14

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(CH_3)，ヒドロキシ基(OH)，カルボキシ基(COOH)及びアミノ基(NH_2)を有するアルカンチオールの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。

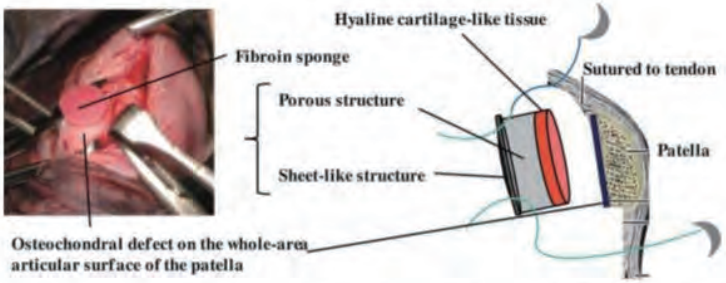


Fig.1. Cartilage repair using a fibroin sponge-based system was attempted for whole-area osteochondral defects of the rabbit patella.

【実験】金薄膜を蒸着したカバーガラス上にメチル基(CH_3)，ヒドロキシ基(OH)，カルボキシ基(COOH)及びアミノ基(NH_2)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 Tatehata[1], Akira Tatsumi[1], Rin Hiraiwa[2], Yusuke Arima[3], Yasusi Tamada[4], Tetsuji Yamaoka[1]
[1]Graduated school of Engineering, Kyoto University, [2]Undergraduated school of Engineering, Kyoto University, [3]Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, [4]Faculty 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

1C-15

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, [2] Ewha Womans University, College of Pharmacy, [3] 早稲田大学　理工学術院
○秋山義勝[1], Hyo Kyoung KWON[2], 原口裕次[1], 坂口勝久[3], 大和雅之[1], Hyukjin LEE[2], 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、eGFPT 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 法のよって 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 AKIYAMA[1], Hyo Kyoung KWON[1], Yuji HARAGUCHI[2], Katsuhisa SAKAGUCHI[1], Masayuki YAMATO[1], Hyukjin LEE[2], Tatsuya SHIMIZU[1]
[1] Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, [2]Ewha 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

1C-16

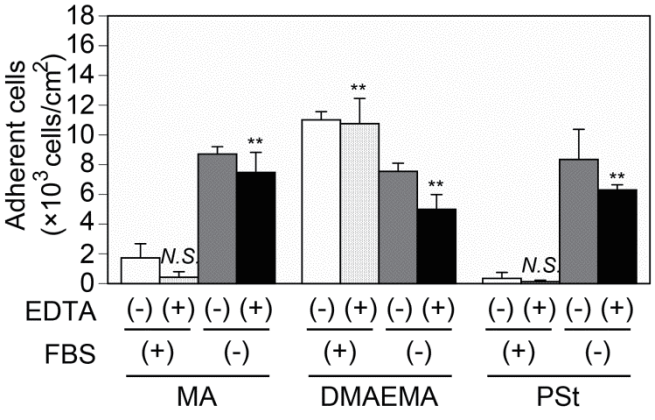
電荷を有する高分子基板への細胞の初期接着機構の解析

[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(PSt)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 細胞および子宮頚がん細胞株である 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>PSt 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>PSt の順に接着力は弱くなったが、血清培地中では DMAEMA>>MA、PSt 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ラン硫酸の 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。



図：各基板上での EDTA による細胞接着阻害効果

Analysis of initial cell adhesion mechanisms on charged polymer substrates

Takashi Hoshiba[1,2,3], Chiaki Yoshikawa[3], Keita Sakakibara[4]
[1]Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, [2]iFront, Yamagata University, [3]National Institute for Materials Science, 4Institute for Chemical Research, Kyoto University
Tel: +81-238-26-3585, E-mail: thoshiba@yz.yamagata-u.ac.jp

1C-17

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。

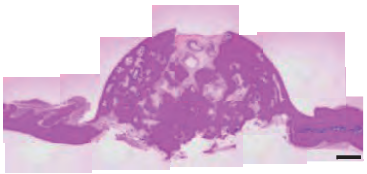


Fig.1 The extra-vertical bone augmentation (16 weeks)

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

Yuki Bando[1], Hiroki Kayashima[1], Takuya Ishimoto[2], Takayoshi Nakano[2], Hiroki Egusa[3], Hirofumi Yatani[1]
[1]Department of Fixed Prosthodontics, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan
[2]Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan
[3]Division 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

1C-18

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℃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。

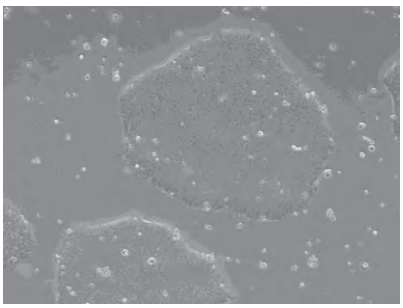


図　bFGF 徐放性シート添加培養液で培養されたヒト iPS 細胞

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 Oyane[1], Maki Nakamura[1], Hiroko Araki[1], Kumiko Higuchi[2], Yuzuru Ito[2], Masaki Adachi[3]
[1]Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
[2]Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, AIST, [3]Katayama Chemical
Tel: +81-29-861-4693, Fax: +81-29-861-3005, E-mail: a-oyane@aist.go.jp

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
〇正本和誉 [1]、藤林俊介 [1]、薮塚武史 [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*:日本白色家兎(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 1.0×10^4cells/cm^2 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

1D-02

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
○髙橋　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。まだ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 Takahashi[1], Alaa Terkawi[1], Gen Matsumae[1], Tian Yuan[1], Hend Alhasan[1], Masanari Hamasaki[1], Norimasa Iwasaki[1]
[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

1D-03

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

[1]Department of Orthopedic Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine
○M Alaa Terkawi[1], Hend Alhasan[1], Gen Mastumae[1], Daisuke Takahashi[1], Norimasa Iwasaki[1]

【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 (μCT) 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 Terkawi[1], Hend Alhasan[1], Gen Mastumae[1], Daisuke Takahashi[1], Norimasa Iwasaki[1]
[1]Department 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

1D-04

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】人工関節界面でみ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 5 mm 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．

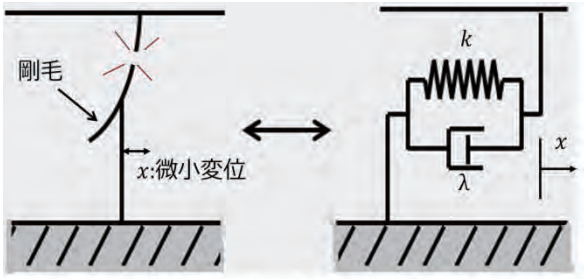


Figure 1 Schematic drawings of the friction model

【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 Ohtsu[1], Masaya Higaki[1], Naoya Hatano[1], Shinji Mikami[1], Tatsuya Ohtsu[1], Mitsuhiro Matsumoto[1], Daisuke Kono[2], Atsushi Matsubara[2], Naohide Tomita[1]
[1]Department of Mechanical Engineering and Science, Kyoto University
[2] Department of Micro Engineering, Kyoto University
Tel: 075-383-3642, Fax: 075-383-3642, E-mail: ootsu.youhei.52n@st.kyoto-u.ac.jp

1D-05

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-無機ハイブリット粒子に注目した。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-無機ハイブリット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ションを調製した。次に CO_2 雰囲気下でピッカリングエマルションを 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シ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ションに付着した $CaCO_3$ 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。

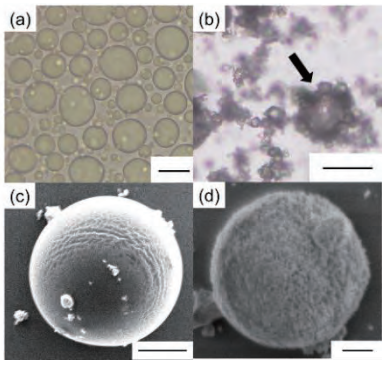


Figure 1. Microscopic image. (a) Coacervate droplets. (b) Pickering emulsion. (c) $CaCO_3$ capsules. (d) CO_3Ap capsules.

Preparation of biodegradable coacervate-CO_3Ap composite capsules for bone regenerative scaffold

Syuuhei KOMATSU[1], Yui IKEDO[1], Hokuto SANTA[1], Taka-Aki ASOH[2], Ryo ISHIHARA[1], Akihiko KIKUCHI[1]
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

1D-06

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] 東京理科大院基礎工，[2] 物材機構（NIMS）国際ナノアーキテクトニクス研究拠点（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，腫瘍摘出後の構造力学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うる (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調製を検討した。

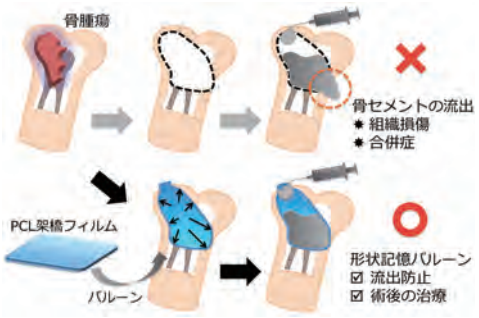


Figure 1. Schematic illustration of PCL balloon system for bone tumor treatment.

【実験】

形状記憶バルーンの作製のため，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】

^{1}H-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 ℃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 ℃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。

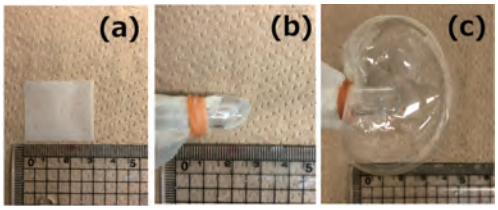


Figure 2. (a) Original PCL film. (b) Before and (c) after shape changing by air pressure.

【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

Development of Shape-memory Balloon for Bone Tumor Treatment

Sosuke OUCHI[1,2], Eri NIIYAMA[2,3], Akihiko KIKUCHI[1] and Mitsuhiro EBARA[1,2,3]
[1]Dept. Materials Science and Technology, Tokyo University of Science, [2] International Center for Materials Nanoarchitectonics (WPI-MANA), National Institute for Materials Science (NIMS),
[3] Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba
[2] Tel: +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]，髙市敦士[4]，陳　鵬[2]，蘆田茉希[2]，土居　壽[2]，塙　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 材および歯科鋳造材を用いた。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 °C1 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鋳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 材が歯科鋳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鋳造材の表面に露出した鋳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 OISHI[1], Yusuke TSUTSUMI[2], Yuka KAJIMA[1,3], Atsushi TAKAICHI[4], Peng CHEN[2], Maki ASHIDA[2], Hisashi DOI[2], Takao HANAWA[2]
[1]Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, [2]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [3]Graduate School of Engineering, Tohoku University, [4]Dental Hospital, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8011, Email: ma170021@tmd.ac.jp

1D-08

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り、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、$TiAl_6V_4$ 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 Ca^{2+} 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。

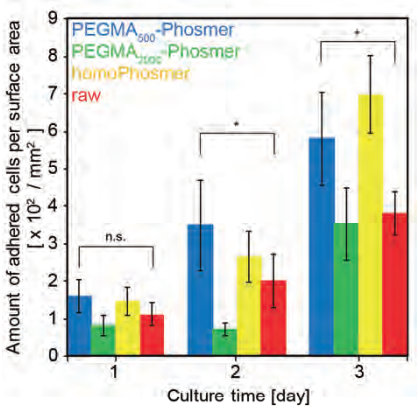


Figure 1. The amount of adhered cells on $PEGMA_{500}$-Phosmer, $PEGMA_{2000}$-Phosmer, homoPhosmer coated and raw Ti alloy surfaces after incubation for 1, 2 and 3 d with MC3T3-E1 cell (2×10^4 cells/mL, 0.5 mL) suspensions.

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

Xinnan Cui[1], Tatsuya Murakami[2], Yukihiko Tamura[3], Kazuhiro Aoki[4], Yu Hoshino[1], Yoshiko Miura[1]
[1]Department of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Kyushu University
[2]Center for Nano Materials and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology
[3]Pharmacology, Department of Bio-Matrix, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
[4]Department 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

1D-09

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．

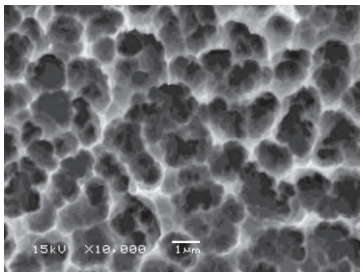


図 1　硫酸処理後の MDF チタン表面の SEM 像

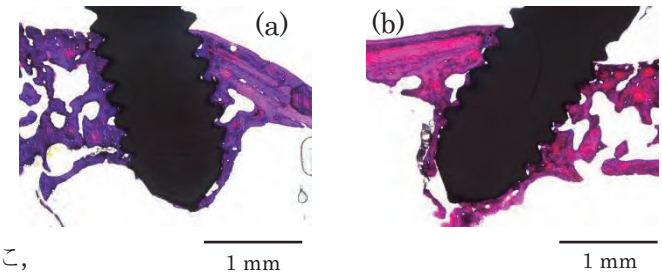


図 2　MDF チタンインプラントの病理組織像
a) 無処理 MDF インプラント，
b) 酸処理 MDF インプラント

【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．

Improvement of bone formation ability of MDF Titanium by surface treatment Ginga Suzuki[1], Masatsugu Hirota[2], Masao Yoshinari[3], Noriyuki Hoshi[4], Katsuhiko Kimoto[4], Hiromi Miura[5], Tohru Hayakawa[2], Chikahiro Ohkubo[1], [1]Department of Removable Prosthodontics, Tsurumi Univesrsity School of Dental Medicine, [2]Department of Dental Engineering, Tsurumi Univesrsity School of Dental Medicine, [3]Tokyo Dental College Oral Health Science Center, [4]Prosthodontics & Oral Implantology, Graduate School, Kanagawa Dental University, [5]Department 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

1D-10

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（TiO_2）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℃，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/cm^2 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 Nozaki[1], Kenichiro Hayashi[2], Zhenquan Tan[3], Naohiro Horiuchi[1], Kimihiro Yamashita[1], Hiroyuki Miura[2], Satoshi Ohara[4], Keiji Itaka[1]
[1]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [2]Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, [3]Dalian University of Technology, [4]Joining and Welding Research Institute, Osaka University
Tel: +81-3-5280-8087, Fax: +81-3-5280-8088, E-mail: k.nozaki.fpro@tmd.ac.jp

1D-11

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-KH_2PO_4-NaOH）を 90℃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 um 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 um 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．

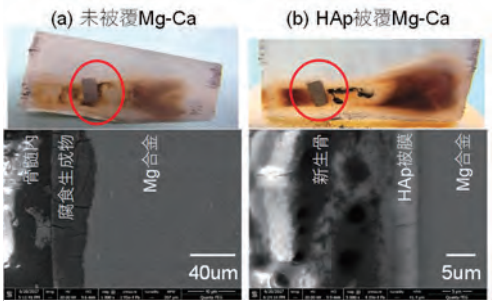


図 1　ラット大腿骨埋入 10 日後の(a) 未被覆および(b) HAp 被覆 Mg-Ca 合金の骨髄と接していた表面の断面 SEM 像．

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 Hiromoto [1], Etsuro Nozoe [2], Kotaro Hanada [3], Takashi Koga [2], Takuya Yoshimura [2], Kaori Shima [2], Toshiro Kibe [2], Kenishi Kume [2], Norifumi Nakamura [2]
[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

1D-12

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 基板上に 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 25μm 未満に粉砕した。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($C_3H_5(OH)_3$)および粒子電荷調整剤、$Mg(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ 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、ZrO_2 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 Uchikoshi[2], Masayoshi Uezono[1], Masanori Kikuchi[2], Keiji Moriyama[1]
[1]Department of Maxillofacial Orthognathics, Graduate School of Tokyo Medical and Dental University
[2]Research 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

1D-13

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], 蔀 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℃）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/cm^2）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。

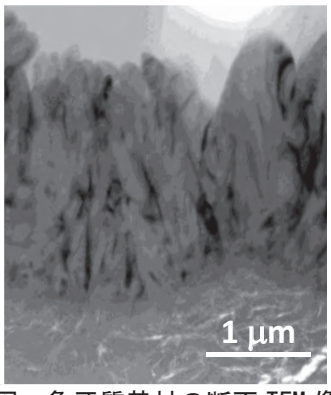


図　象牙質基材の断面 TEM 像

[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 Oyane[1], Ikuko Sakamaki[1], Maki Nakamura[1], Kenji Koga[1], Kanako Shitomi[2], Kayoko Mayumi Hirofumi Miyaji[2]
[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

1D-14

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 Sakai[1], Takahisa Anada[2], Yukari Shiwaku[1,3], Ryo Hamai[1], Kaori Tsuchiya[1], Osamu Suzuki[1]
[1]Division of Craniofacial Function Engineering Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan,
[2]Soft Materials Chemistry, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Fukuoka, Japan
[3]Liaison 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

1D-15

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 Jun[1]，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($Ca_3(PO_4)_2$, β-TCP)、Ta_2O_5 および Ag_2O 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ヨン培地(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。

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

【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.

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

Kyosuke Ueda[1], Jun Wu[1], Takayuki Narushima[1]
[1]Department of Materials Processing, Tohoku University
Tel: +81-22-795-7295, Fax: +81-22-795-7295, E-mail: ueda@material.tohoku.ac.jp

1D-16

銀または銅をドープ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(TiO_2)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プし、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、ドープする金属元素によっては TiO_2 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 TiO_2 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、銀または銅をドープした 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℃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℃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℃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℃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、ドープした各抗菌金属元素は、AL-Ag-HT においては Ag および Ag_2O、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、銀や銅をドープした 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、銅をドープした 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。

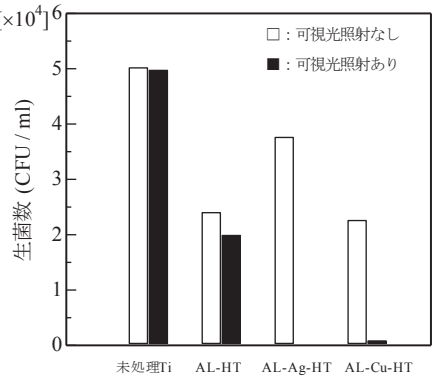


Figure 1. Visible bacteria count of *E. coli* on samples with or without irradiation of visible light.

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

Kanae Suzuki[1], Masakazu Kawashita[1], Misato Iwatsu[2], Takayuki Mokudai[3] and Hiroyasu Kanetaka[2]
[1]Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University, [2]Graduate School of Dentistry, Tohoku University, [3]Institute for Materials Research, Tohoku University
Tel: +81-022-795-3937, Fax: +81-022-795-4735, E-mail: kanae.suzuki.r1@dc.tohoku.ac.jp

1D-17

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 ℃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 回分の歯摩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 H_2S 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 YOKOGAWA[1], Kodai KAKEHASHI[1], Hidemitsu WAKABAYASHI[1], Kazuki OIKE[2], Yuki MORITA[2], Kazuo FUJII[2], Yutaka DOI[2], Harumi KAWAKI[2], Masato HOTTAa[2],
[1]Graduate School of Engineering, Osaka City University [2]School of Dentistry, Asahi University
Tel: +81-6-6605-2743, Fax: +81-6-6605-2743, E-mail: yokogawa@imat.eng.osaka-cu.ac.jp

1D-18

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]，葩島由二[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、μCT 測定後に埋植材を頭蓋骨組織と共に摘出した。得られたμCT 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μCT 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。μCT 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。

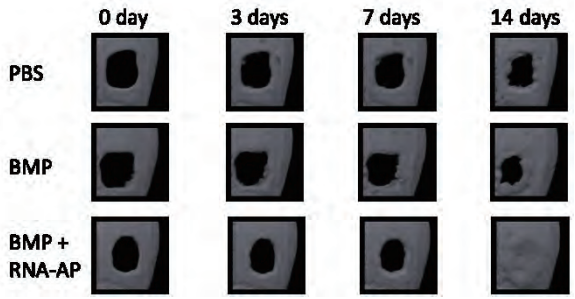


図 1 .各試料含浸材料の
ラット頭蓋骨埋植試験結果

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

Yusuke Nomura[1], Ayano Fujisawa[2], Kohei Matsushita[1], Takeshi Toyoda[1], Chie Fukui[1], Yuki Morishita[1], Kumiko Ogawa[1], Ungil Chung[2], Yoshikazu Nakamura[3,4], Yuji Haishima[1]
[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℃にて進行させ、分液と再沈による精製後に ^{1}H-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%血清中で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。

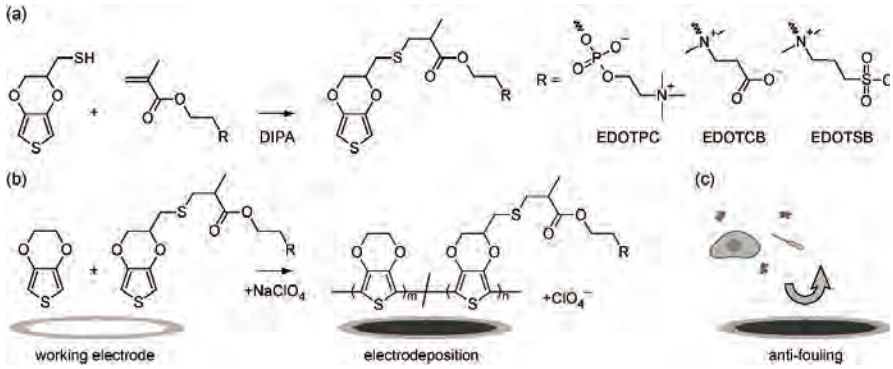


Fig. 1. Synthesis of antifouling and conducting polymer films. (a) Synthesis of zwitterionic EDOTs via thiol–ene reaction. (b) Electrodeposition of zwitterionic EDOTs and EDOT. (c) Schematic diagram of antifouling properties of electrodeposited zwitterionic PEDOT films.

【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 Goda[1], Yuji Miyahara[1]
[1]Dainstitute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8097, Fax: +81-3-5280-8135, E-mail: goda.bsr@tmd.ac.jp

1E-02

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 GPIIbIIIa 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（GPIIbIIIa）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℃、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 GPIIbIIIa との相互作用（リガンドーレセプター結合）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ー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。

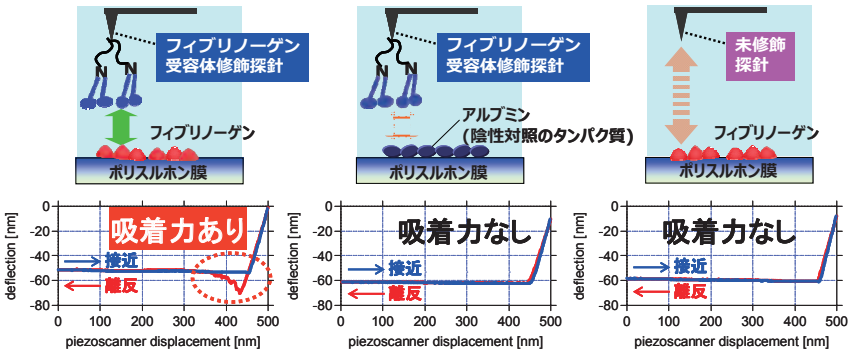


Fig.1 Schematic illustrations of respective AFM measurement and its force curve.

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

Yuichi Muraji[1], Yoko Koga[2], Yoshiyuki Ueno[3], Hiroaki Fujieda[3]
[1]Surface Science Laboratory, Toray Research Center, Inc., [2]Pharmaceutical Research Laboratory, Toray Industries, Inc., [3]Advanced Materials Laboratory, Toray Industries, Inc.
Tel: +81-77-533-8599, Fax: +81-77-533-8628, E-mail: Yuichi_Muraji@trc.toray.co.jp

1E-03

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ヤ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-プロパンスルトン、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。

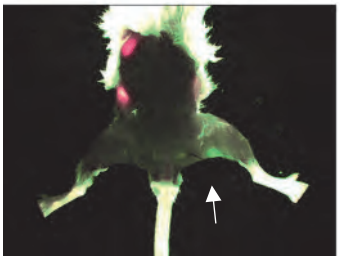


Figure 1. Fluorescence imaging of lymph node by using fluorescent S-terminal dendrimer. The arrow indicates the lymph node.

[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 Nagashima[1], Yutaka Nishimoto[1], Takayuki Ohira[2], Kohei Nakajima[2], Mayu Tomita[2], Mikako Ogawa[2], Chie Kojima[1]
[1]Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University
[2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
Tel: +81-72-254-8190, E-mail: kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

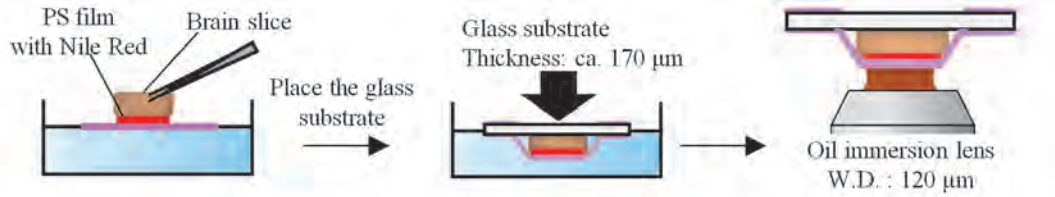
1E-04

撥水性超薄膜を活用したカバーグ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】SiO_2 基板(40 × 40 mm)上にポリビニルアルコール水溶液(PVA, 10 mg/mL)をスピンコート(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)を同条件にてスピンコートした。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】SiO_2 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)の順にスピンコートし、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 Zhang[2], Kenji Yarinome[1], Taiga Takahashi[3], Kohei Otomo[3], Ryosuke Kawakami[4], Tomomi Nemoto[3]
[1]Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University. [2]Micro/Nano Technology Center, Tokai University. [3]Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University. [4]Ehime University Graduate School of Medicine.
[1]Tel: 0463-58-1211 (Ex.4692), FAX: 0463-50-2426, E-mail: y.okamura@tokai-u.jp

1E-05

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 μmol/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。

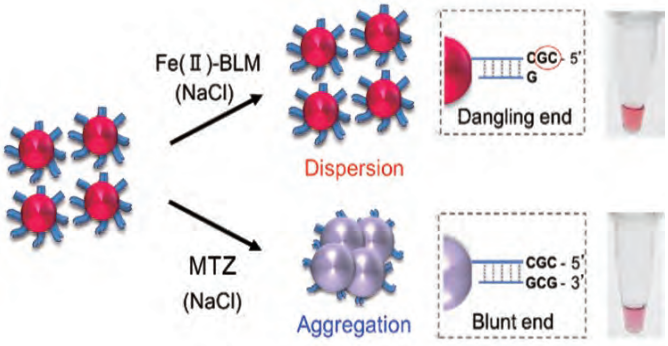


Figure 1 Colorimetric assay of sequence specific BLM-mediated DNA Cleavage based on dsDNA-GNP with a dangling end.

【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 Kimura[1], Yoshitsugu Akiyama[2], Tohru Takarada[3], Mizuo Maeda[3], Akihiko Kikuchi[1]
([1]Dept. Mater. Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Sci., 6-3-1 Niijuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan, [2]Fac. of Ind. Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Sci., 102-1 Tomino, Oshamambe-cho, Yamakoshi-gun, Hokkaido 049-3514, Japan, [3]Bioengineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan) [2]Tel: +81-1377-2-2803, E-mail: yoshitsugu.akiyama@rs.tus.ac.jp

1E-06

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、スペ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滴下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/μg、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/μg、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 μg/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

1E-07

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

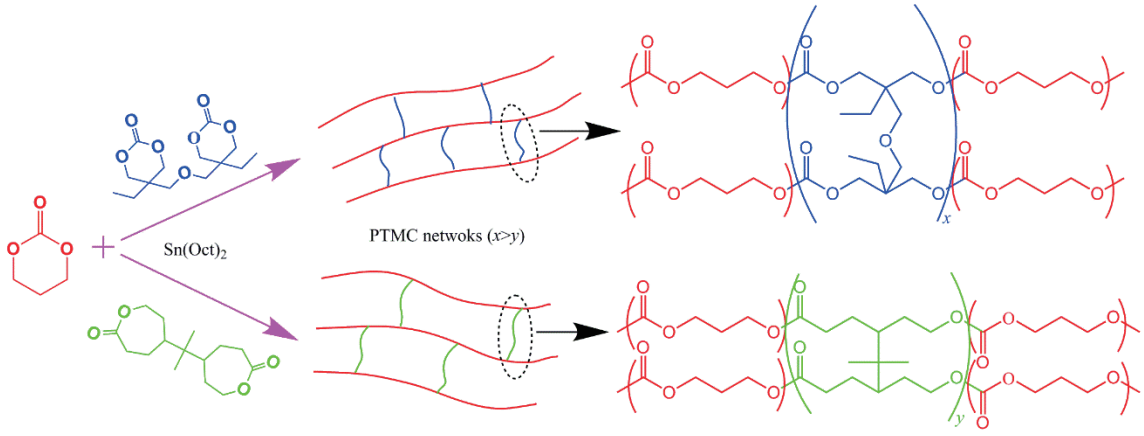
[1] Liaoning Research Institute of Family Planning, China Medical University; [2] Key Laboratory of Reproductive Health and Medical Genetics, National Health Commission of China; [3] Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University; [4] National Engineering Research Center for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

【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 ℃), 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 μm/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.

1E-08

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 $B_{12}X_{12}^{2-}$(X = H , Cl , Br , 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 $B_{12}Br_{12}^{2-}$の結合定数は 9.6×10^5 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 $Na_2B_{12}Br_{11}O$-$C_{12}H_{25}$ (DB-C_{12}) 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-C_{12}, HPG-*g*-γ-CD の合成: 水中に溶解した $Na_2B_{12}H_{12}$ に H_2SO_4 を加えて $Na_2B_{12}H_{11}OH$ を調製した後、臭素化し、$Na_2B_{12}Br_{11}OH$ を得た。これと、KOH 存在下、DMSO 中で $C_{12}H_{25}$-Br と反応させることにより DB-C_{12} を合成した。これらの合成の確認を、^{1}H-,^{11}B-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=4k), (M_n=7k) を得た。合成の確認を MALDI-TOF-MS, ^{1}H-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-C_{12} 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 ^{1}H-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-C_{12} 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=4k) + DB-C_{12} 混合系では 160 nm の粒子が見られ、HPG-*g*-γ-CD (M_n=7k) + DB-C_{12} 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増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-C_{12} 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-C_{12} 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-C_{12} 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、C_{12} 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。

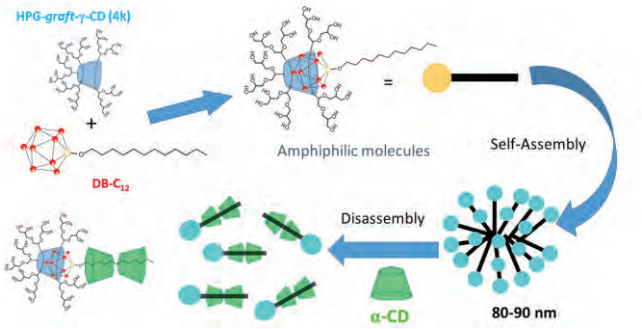


Fig.1 Proposed mechanism of the supramolecular assembly

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

Kazuhiro Yamamoto[1], Tooru Ooya[1]
[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

1E-09

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。

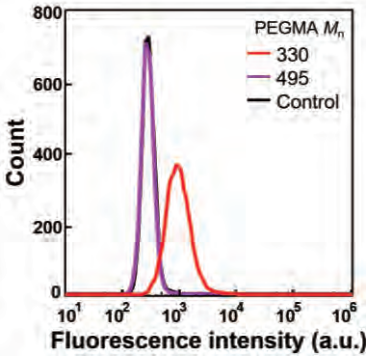


Fig. 1. Flow cytometry histogram profiles of L929 cells treated with P(St-*co*-PEGMA) particles with a PEG content of 14 mol% (M_n=330) and 16 mol% (M_n=495) at 37 °C for 4 h. The concentration of P(St-*co*-PEGMA) particles was 0.5 mg/mL.

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

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

1E-10

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 x 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。

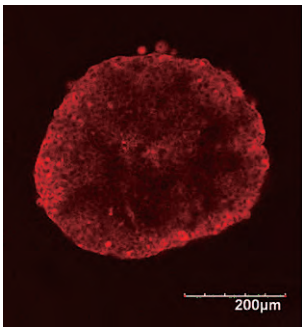


図 1　ドキソルビシン修飾 P(DMAPS-ran-PEGMA)の細胞スフェロイド内分布

[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

1E-11

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 健太朗[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ッ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, methacryloxyethyl thiocarbamoyl rhodamine B、V-50 を添加し、70℃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、鋳型 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 $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ を加え、$NaBH_4$ 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 KITAYAMA[1], Takuya YAMADA[1], Kentaro KIGUCHI[1], Aoi YOSHIDA[1], Hiroaki AKASAKA[2], Yuya Nishimura[1], Kazunori IGARASHI[2], Yu MATSUMOTO[3]、Ryohei SASAKI[2]、Toshifumi TAKEUCHI[1] ([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

1E-12

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応答して崩壊するため，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。

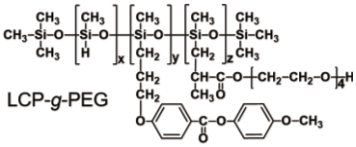


Fig. 1. Structure of LCP-*g*-PEG.

【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。

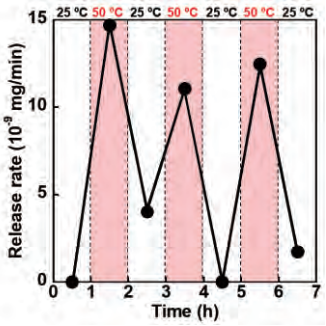


Fig. 2. Fluorescein release profile from Flu-loaded LCP-g-PEG assemblies in response to stepwise changes in temperature between 25 and 50 °C.

【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，自己集合体が取り込まれたと考えられる。

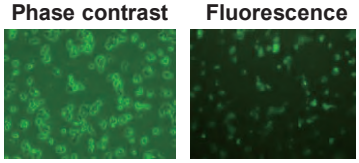


Fig. 3. Phase and fluorescence images of the HepG2 cells incubated with fluorescein-loaded self-assemblies at 30 ºC for 12 h. The LCP-*g*-PEG self-assemblies concentration was 0.09 mg/mL.

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

Yuki Hirano[1], Yasuaki Inoue[1], Akifumi Kawamura[1,2], Takashi Miyata[1,2]
[1]Fac. of Chem., Materials and Bioeng. and [2]ORDIST, 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

1E-13

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 ORDIST[2]・関西大医工薬研セ[3]
○山本洋輝[1]・能﨑優太[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応答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**)。

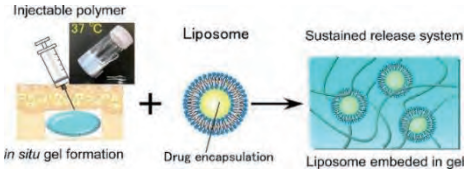


Fig. 1. Design of sustained release system using liposome embedded in IP gel.

【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 ℃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 後で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。

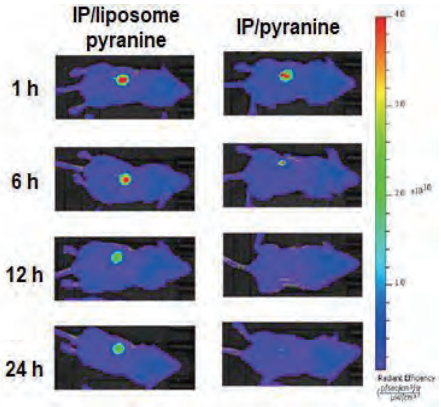


Fig. 2. Fluorescence images of mice received s.c. injection of IP formulation analysed by IVIS.

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 YAMAMOTO[1], Yuta YOSHIZAKI[2], Akinori KUZUYA[1, 3], Yuichi OHYA[1, 3] ([1]Faculty of Chem., Mater. & Bioeng., [2]ORDIST , [3]CEMP, 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

1E-14

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。

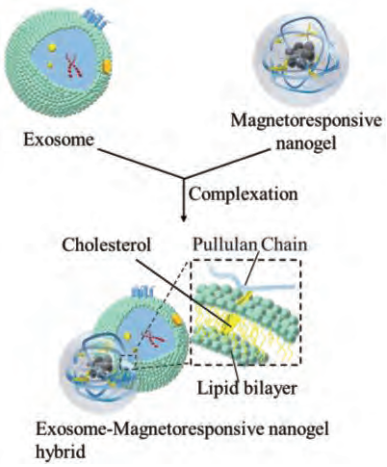


Figure.1 Preparation of Exosome-Magnetoresponsive nanogel hybrid

【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、磁性ナノゲルー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ー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-magnetoresponsive nanogel hybrid for control of cellular funtions

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.ryousuke.62w@st.kyoto-u.ac.jp

1E-15

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の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 ^{1}H 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、所定の比率で撹拌混合することで 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 Catiomers (siRNAsomes) for siRNA Delivery

Kanjiro MIYATA[1], Beob Soo KIM[1], Sayan CHUANOI[1], Tomoya SUMA[1], Yasutaka ANRAKU[1], Mitsuru NAITO[2], Hyun Jin KIM[2], Akihiro KISHIMURA[3], Kazunori KATAOKA[4]
[1]Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, [2]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, [3]Graduate School of Engineering, Kyushu University, [4]Innovation 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

1E-16

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/cm^2, 面積 4.5 cm^2 ）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上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。

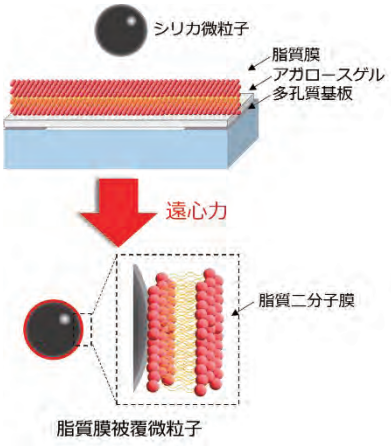


Fig 1. 脂質二分子膜被覆微粒子の作製法

【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 Inoue[1], Yoshihiro Sasaki[1], Shin-ichi Sawada[1], Kazunari Akiyoshi[1] ([1]Graduate 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

1E-17

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）複合体の構造的問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。

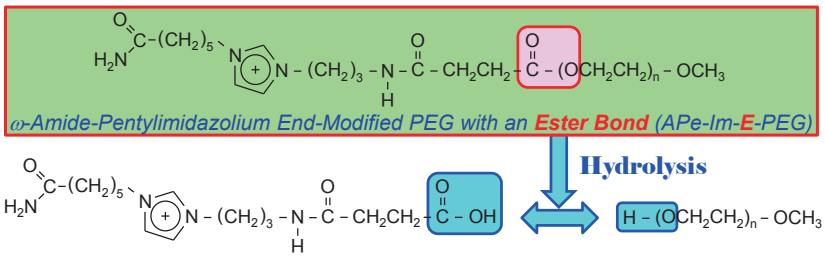


Figure 1. Design of a ω-amide-pentylimidazolium end-modified PEG with an ester bond (APe-Im-E-PEG).

【実験】

MIC は pDNA と APe-Im-E-PEG を水中で混合して 37℃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 Asayama[1], Sakura Taneichi[1], Hiroyoshi Kawakami[1], Yoichi Negishi[2]
[1]Department of Applied Chemistry, Tokyo Metropolitan University
[2]School 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

1E-18

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　広域科学専攻相関基礎科学系
○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．

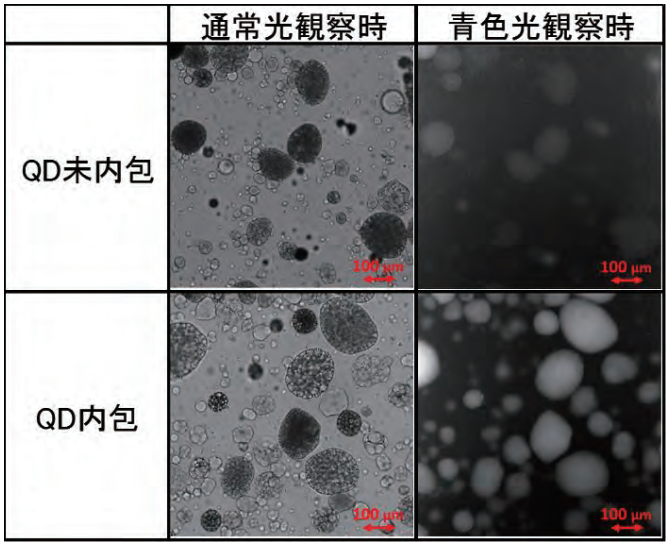


図　蛍光顕微鏡観察の比較

Fundamental study on new drug release system triggered by ultrasound

Taiki Nakada[1], Taro Toyota[2], Kenji Yoshida[1], Hideki Hayashi[1]
[1]Center for Frontier Medical Engineering, Chiba University
[2]Graduate School of Arts and Science, Tokyo University
Tel:+81-043-290-3114, FAX:+81-043-290-3403, E-mail:aeua2274@chiba-u.jp

口 頭 発 表

第 2 日: 11 月 13 日（火）

製品化を見据えた人工臓器開発におけるマテリアルの重要性

[1]国立循環器病研究センター研究所　人工臓器部，
○築谷　朋典[1]，水野　敏秀[1]，武輪　能明[1]，巽　英介[1]

【はじめに】
循環器あるいは呼吸器系疾患の治療のために，血液ポンプあるいは膜型人工肺のような能動的デバイスが用いられる．治療目的により使用期間は大きく異なり，体外設置で数日〜一ヶ月程度の使用で済むものもあれば，体内に植え込まれて数年以上交換なしで使用されるものもある．多くは臓器機能の代替が目的であり，ほぼ生体に吸収されることはない．血液接触面における抗血栓性の確保は，材料あるいはその表面性状のみならず，材料表面近傍の流動状態および患者自身の血液凝固能にも強く影響されるため，血栓に関連する合併症の抑制は極めて困難な問題である．またデバイスに由来する感染のコントロールも治療の成否を左右する重要な因子である．このように，生体と接触する医療機器においてそのマテリアル開発は極めて重要な課題である．

【実例：人工心臓の抗血栓性確保】
抗血栓性を実現するために現在用いられている方策は，1)血液接触面に何も付着しないようにする 2)血液接触面上に内皮細胞や内膜を成長させ表面を被覆させる　のどちらかである．体外設置型機器は使用期間も限定されるため，研磨等による表面の平滑化や抗血栓性コーティングによる1)を目的とするものが多い．一方体内植込み型補助人工心臓のように，今後平均待機期間が 5 年を超えることが予測されている心臓移植患者に交換無しで使用される補助人工心臓は，それ以上の期間連続使用されることが前提であり，以下に示すように 1)2)が混在する方策がとられている．

脱血カニューレ：心尖部より外科的に左心室内に挿入される管路の先端部であり，左室壁を貫通する．左室内に露出した部分は全て血液に接触する．露出する部分ならびに貫通部は，当初は平滑な金属あるいはポリマーであったが，表面に微小なチタンビーズを焼結(sintering)させて三次元的な空隙を持たせることによって挿入後数週間で擬内膜が形成され，表面を均一に被覆することで十分な抗血栓性を発揮できることが明らかになって以来，現在ではほぼ全ての人工心臓システムでこのタイプの表面加工が用いられている．

血液ポンプ内面：多くの血液ポンプは極めて平滑度の高いチタン合金製であり，抗血栓性物質のコーティングが施されている．内部では羽根車が高速回転しており，内面は高せん断応力に曝されている部位がほとんどを占める．しかし部品間の段差などでは微視的に血流が停滞する場所が存在するため，コーティングの効果も重要である．心臓移植に到達し，取り外した人工心臓の内面は，血栓形成のない「綺麗な」状態であることが多いが，内部で形成された血栓がそのまま残留して成長する場合と，成長過程で血流にのって飛散する場合が考えられるため，ポンプ内面の観察結果のみでは判断できない場合が多い．現在最も長期間使用されているもので 10 年を超えるものが出始めるなど，治療目的からは実用的なレベルに十分達していると推測されるが，例えばコーティングがどの程度残留しているかなど，抗血栓性効果の経時的変化は臨床において調査されることはほとんどない．初期のコーティングがそのまま残留しているとは考えにくいため，使用後の血液接触面観察による新しい知見の蓄積が期待される．

皮膚貫通ケーブル（ドライブライン）：補助人工心臓装着患者の管理上最大の問題点となるのが皮膚を貫通するドライブラインである．ドライブラインは細ければその分柔軟性も増し，接触面積も小さくなるため感染対策としては有利である一方，ドライブラインの強度を犠牲にしてしまうという問題もあり長期使用後の断線等が数多く報告されているなど，未だに重要な開発課題である．将来的にはワイヤレス給電による駆動の技術の開発も進められている．

【結語】
人工心臓のように数年間にわたり使用される機器は使用開始時の状態を維持することは難しく，時間経過と共に合併症を起こさない範囲でいかに生体と「なじむ」ように設計を行うかが重要であると考えている．

Development of Ventricular Assist Devices and Membrane Oxygenators

Tomonori Tsukiya[1], Toshihide Mizuno[1], Yoshiaki Takewa[1], Eisuke Tatsumi[1]
[1]Department of Artificial Organs, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
Tel: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5406, E-mail: tsukiya@ncvc.go.jp

2A-S2-2

機械弁素材と生体弁組織固定法：その術後抗凝固療法と長期遠隔成績

[1] JCHO 九州病院　心臓血管外科、[2]九州大学病院　心臓血管外科
○徳永　滋彦[1]，落合　由恵[1]，馬場　啓徳[1]，久原　学[1]、安東　勇介[1]，塩瀬　明[2]

心臓弁膜症はリウマチ性から変性疾患への変遷や、高齢化社会に伴う人工弁選択の変化等その治療体系も近年変化してきている。弁膜症に対する治療として使用される心臓人工弁は 1960 年の Ball-Cage valve 登場以降、その進化は目覚しいものがあり、その後の心臓弁膜症患者の予後は飛躍的に改善した。しかし、生体弁、機械弁ともに依然解決できていない問題も残されていることも事実である。今回、人工弁のマテリアル（機械弁の素材、生体弁の組織固定法）に関してその変遷と進化、そして臨床の現場における術後抗凝固療法、そして人工弁の長期成績について触れてみたい。

【機械弁】

かつて使用されていた Ball-Cage valve はポリエチレンやシリコン製ボールがケージの中を移動し、ボールがラムネ玉のように前後して血液の逆流を防ぐという簡単な構造であった。これは素材の耐久性に劣っていた。その後パイロライトカーボンの出現により耐久性が劇的に改善した。これは熱硬化性樹脂を 2000℃付近で加熱炭化させ、①金属より軽い ②耐疲性に優れている ③生体との親和性が高く抗血栓性に優れている、などの特徴を持つものであり“パイロライトカーボンは 4 億回の開閉運動に耐えうる”とも言われている。現在の機械弁はすべてこの素材で作られ、主に二枚の弁葉が開閉する二葉弁が主流である。ただパイロライトカーボン製機械弁は耐久性があるが血栓塞栓症をきたしやすいため障害にわたるワーファリン内服を必要とする。一般的に若年患者は機械弁が推奨される。

【生体弁】

生体弁の開発は Carpentier が組織を固定（架橋）することで強化し抗原性をなくすグルタールアルデヒド処理技術を確立したことに始まる。当初はブタ弁が用いられその後石灰化処理が施された。高圧処理、低圧処理法が開発され、そして無圧固定処理の牛心膜弁の出現を見た。その後より耐久性を高めるため、温処理を加えた ThermaFix 石灰化抑制処理技術（牛心膜弁）、AOA（α アミノオレイン酸）石灰化抑制処理+生理的無圧固定化処理（ブタ弁）などが採用されている。これらの生体弁の保存はグルタールアルデヒド溶液浸漬保存であった。最新の牛心膜処理では組織から不安定なアルデヒドを取り除き、乾燥保存が可能となった Integrity preservation テクノロジーも実用化されている。これは生体弁劣化の原因である石灰化を更に抑制し長期の耐久性が期待される。一般的に高齢患者は生体弁が推奨される。

【術後抗凝固療法】

大まかに言うと機械弁は耐久性があるが生涯にわたるワーファリン内服が必要であり、生体弁は耐久性は劣るがワーファリンはのまなくて良い。機械弁は一般的に PT-INR: 2.0-3.0 でのコントロールが推奨される。例外としてピュアパイロライトカーボンで表面をコーティングしている On-X 弁では PT-INR: 1.5 でも可となっている（欧米のみ）。生体弁では基本的に抗凝固療法は必要ないが術後 3 ヶ月間のみ PT-INR: 2.0-3.0 でのコントロールが推奨される（心房細動患者は心房細動治療に準ずる）。

【人工弁長期成績】

パイロライトカーボン二葉弁として最も歴史の長い St. Jude Medical 機械弁の 25 年の成績では大動脈弁置換術後の累積再手術回避率は 93%±1%、僧帽弁置換術後は 92%±3% との報告がある。生体弁においては牛心膜弁をグルタールアルデヒド処理したCarpentier-Edwards牛心膜弁による大動脈弁置換術後遠隔成績（全年齢）では、5年、10年、20年で再手術回避率98%±0.2%、96%±1%、67%±4%であり、若年者（60才未満）では5年、10年、15年、20年で98%±1%、90%±3%、60%±6%、30%±8%、高齢者（70才以上）では5年、10年で100%, 99%±0.5%、と高齢になるほど良好な耐久性を示している。

Material of mechanical valve & Fixation of tissue valve

Shigehiko Tokunaga[1], Yoshie Ochiai[1], Hisanori Baba[1], Manabu Hisahara[1], Yusuke Ando[1], Akira Shiose[2]
[1]Department of Cardiovascular Surgery, JCHO Kyushu Hospital, [2] Department of Cardiovascular Surgery, Kyushu University Hospital Tel: +81-93-641-5111 Fax: +81-93-642-1868, E-mail: stokunagajp@kyudai.jp

現状の人工血管と問題点

神戸大学大学院医学系研究科　外科学講座　心臓血管外科

田中裕史

理想的な人工血管が備えるべきものとして、①利便性、②種々のサイズが利用できる、③低血液漏出性、④感染抵抗性、⑤抗血栓性、⑥自己血管と同等のコンプライアンス、⑦耐久性があげられる。

材料として、歴史的に金属、陶器、象牙、絹、ナイロン等様々な物質が研究されたが、特に抗血栓性、耐久性の問題で、適合しなかった。ファブリックの登場は 1952 年 Voorhees らによって、Vinylon N を用いてもたらされたが、これも抗血栓性に問題があり、普及しなかった。1958 年 DeBakey によって Polyethylene terephthate (Dacron)を用いたファブリックによる人工血管の移植が施行され、続いて expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)の使用が開始、この二つが現在でも広く普及している。

血液漏出性については Farbric はそのままでは多少の血液漏出を防ぐことはできず、以前は自己血液による preclotting を行なっていたが、現在はダクロンの人工血管にウシゼラチンまたはアルブミンコーテイングを行い、術中の血液漏出を減少させている。このコーテイングは通常であれば三週間程度付着しており、この間にフィブリン等が付着し血液漏出を防ぐとされているが、長時間の人工心肺となれば、術中にもコーテイングが脱落し、血液漏出が著明となることがある。近年本邦からダクロンの間に樹脂を挟んだ製品が発売され、血液漏出が著明に減少したが、やや操作性が悪く改良の余地があると思われる。

これらの材質を用いた人工血管は、大動脈疾患、末梢血管疾患、先天性心疾患に現在幅広く利用され、6㎜ 以上の口径の人工血管に関しては、満足のいく成績が得られている。しかしながら、6㎜ 未満の口径の人工血管の開存率は満足すべきものではなく、また 3㎜ 未満の人工血管は抗血栓性の問題から、未だ市販されているものはない。下腿部への血行再建の血流導管としては、自家静脈が使われることが多いが、利用可能な充分な長さの自家静脈が存在せず、難渋、さらには断念することもあり、抗血栓性の高い小口径人工血管は長年の悲願である。汎用性、均一性、径のラインアップ、および無菌的管理等考慮すると、バイオ人工血管ではなく、工業製品としての小口径人工血管の出現は、血管外科医としては待望するところである。

また Dacron 製の人工血管は感染に弱く、実験では ePTFE 製の方が菌の繁殖がしにくいというデータはあるが、臨床的に明らかではない。欧米では銀コーテイングされた人工血管が感染の予防あるいは治療用に市販されているが、本邦では使用できない。感染に強い、あるいは治療に使用可能な人工血管の開発が待たれる。

Hiroshi Tanaka
Cardiovascular Surgery, Kobe University School of Medicine
Tel: +81-78-382-5942, Fax: +81-78-382-5959, E-mail: hirtanak@med-kobe-u.ac.jp

2A-S2-4

革新的医療機器の早期承認のためのバイオエンジニアの役割

早稲田大学医療レギュラトリーサイエンス研究所
○梅津　光生，岩﨑　清隆，松橋　祐輝，坪子　侑佑，笠貫　宏

【緒言】

2014 年の薬事法の大改正により、医療機器は有効性と安全性について独自の科学的に評価・分析することが求められている。「我が国の強みを生かして」、「世界をリード」というような研究募集をよく見かけるが、医療機器開発においては、「失敗をすると悪者さがし」、「薬事の国際戦略を経験したアカデミアが少ない」という我国特有の事情がある。ある工学技術を徹底的に磨き上げても、医療のパートナーやスポンサー企業が見つからず、国際レベルの医療機器にはなりにくい事例も多い。実臨床に即した非臨床評価法を開発初期から頭に入れておくことで、リスクマネージメントや薬事承認のプロセスの迅速化ができることを我々は経験してきた。本講演では、医療レギュラトリーサイエンス（RS）の視点から、革新的医療機器の非臨床の生体適合性評価試験を行った事例を紹介する。

【非臨床評価法の事例紹介】

１）補助人工心臓における血栓形成試験

補助人工心臓は植込初期と植込み後４年以降に血栓形成の問題が生じる可能性が高いことが、心臓移植・人工心臓の患者の国際データベースにより示されている。初期の血栓の飛散リスクを検証する新鮮血を利用した一巡閉鎖系のシミュレーター回路を開発し、それを用いて血栓形成リスク低減を目指したチタンメッシュの新型脱血管の実験を行い、その優位性が提示された。この新型脱血管は、新たな治験をしても本実験データ以上の情報は得られないと規制当局が判断したため、臨床治験なしに承認された。その後、全症例登録のレジストリー（J-MACS）によれば、新型脱血管の脳梗塞の回避率が安定して極めて高い値を維持していることが判明し、本評価法が、長期の血栓合併症を減らすこと、すなわちデバイスの安全性の向上に貢献していることが示された。

２）生体吸収性スキャフォールドの性能評価試験

生体吸収性スキャフォールドは、いわゆる金属製の冠動脈ステントとは異なり、初期の血管拡張力が必要なときだけステントが存在し、最終的には吸収されてなくなる、というコンセプトのもとに、2006 年ころから欧州臨床試験が開始され、2015 年に CE Mark が取得された。これと並行して、米国治験は 2011 年開始、2016 年 FDA 承認、日本は 2013 年から治験開始、米国から 4 カ月遅れて PMDA 承認という歴史がある。金属製ステントの*in vitro* 評価試験法に関しては、革新的医療機器等の国際標準獲得推進事業により、試験ガイドラインの発出、JIS 規格の制定、ISO の追加・改訂が行われた。しかし、生体吸収性の材料の特性から加速試験は難しく、狭窄血管モデルを用いて 72BPM で繰り返し屈曲するモデルでの破断耐久性を調べることとなった。その回路に 37℃リン酸緩衝生理食塩水(pH;7.35)を注入、血圧 120/80 mmHg、流量平均 60mL/min で、拡張期に多く流れる左冠動脈特有の 2 相性の流量波形を再現して、循環させた。実験からは、材料の溶解に伴い、狭窄部分が徐々に復活する状況が確認された。屈曲負荷環境下では 6 週間で、6 か所目の破断が起こり断裂したデータが示され、規制当局を通して販売会社へ伝えた結果、即刻販売が中止された。同時期に EU や米国でも販売制限や注意喚起がなされた。

【結言】

医療 RS をベースに、先進医療機器開発を加速化する非臨床性能評価試験法の事例を挙げたが、その実現には、RS の博士人材の育成が重要と考えた。そこで、2010 年より医療 RS の共同大学院を開設し、今までに 43 件の社会人博士号が授与された。彼らには産官学や国際展開の協議、製品開発・臨床研究の実施において活躍し、我国の医療の発展に貢献してほしいと期待している。

Bioengineers' role towards an early government approval of innovative medical devices

Mitsuo Umezu, Kiyotaka Iwasaki, Yuki Matsuhashi, Yusuke Tsuboko and Hiroshi Kasanuki
Waseda Institute for Medical Regulatory Sciences
Tel: +81-3-5369-7331, Fax: +81-3-5269-9062,　E-mail: umezu@waseda.jp

組織再生を応用した心疾患に対する新たなアプローチの開発

大阪大学大学院医学系研究科　心臓血管外科
上野　高義、宮川　繁、戸田　宏一、倉谷　徹、澤　芳樹

【緒言】近年の小児循環器疾患治療の目覚ましい発展により、ほとんどの先天性心疾患症例が成人期に到達し、その長期遠隔期成績が議論されている。その中で、弁膜症に代表される遺残病変へのアプローチの重要性および問題点が明らかになり、より若年での再治療介入により心機能を温存する治療戦略が考慮されるようになった。しかし、既存の device（人工弁、人工血管など）では耐久性や成長の観点から満足できるものはなく、新たな device の開発が望まれる。さらに、心筋症に代表される心筋変性を認める疾患群に対する効果的な治療法は、最終的治療である心移植以外、未だ開発されていないといっても過言ではなく、さらに先天性心疾患術後の長期にわたる心室圧負荷、容量負荷による心筋障害を治療可能な方法もない。それら問題点を解決するために、我々は組織再生に視点を置いた治療法を開発するためにトランスレーショナルリサーチを行っており、その研究につき報告する。
【方法、結果】①脱細胞組織が生体内で再細胞化され自己組織化することに着目し、新しいコンセプトの人工弁導入リサーチを行っている。先行実験として、まず肺動脈弁を心臓から摘出、そのままの状態で脱細胞処理を行い、新鮮脱細胞化肺動脈弁（DPV）を作成した。この DPV を用いミニブタに対し肺動脈弁置換手術を行い、6 か月後に DPV を摘出し検討を行った。組織学的に弁尖および肺動脈内側が血管内皮細胞により内膜化し、吻合部には線維芽細胞の再播種を認め、さらにそれら細胞からのサイトカインおよび細胞外マトリックスの産生が認められた。その実験結果及び EU 諸国での臨床成績をもとに、ハノーファー医科大学との共同研究により、現在までに 6 例のファロー四徴術後症例に対し DPV を移植し、最長 3 年の経過で良好な成績を収めており、現在本邦における治験準備を行っている。
②重症心不全に対する再生医療として、まず骨格筋芽細胞が損傷した骨格筋の補填をすることに注目し、筋芽細胞から作成した自己筋芽細胞シートを用いた心筋梗塞モデルに対する移植実験を行い、その有効性を基礎研究で証明した。そのメカニズムとして、シートより分泌された各種サイトカインが血管新生や幹細胞集積を誘導し、それにより心筋組織修復が起こることが明らかとなった。この実績から、臨床応用として補助人工心臓を装着した成人症例に自己筋芽細胞シートを移植、以後 2 例の人工心臓離脱を行いえた。それ以降の成人の実績をもとに、テルモ社によるハートシートが製造販売承認され、2016 年より保険診療が可能となった。小児への応用として、2014 年に 12 歳の拡張型心筋症患者に筋芽細胞シート移植を行い、現在ハートシートの小児への適応拡大を目的として治験を 3 症例に行い経過観察中である。また、さらなる効果を目指し、現在、iPS 細胞より分化誘導、作成された心筋シートを用いた心筋症治療の臨床応用を計画中である。
【まとめ】当科で進行中である、組織再生に着眼した循環器疾患のトランスレーショナルリサーチを紹介した。これらリサーチは臨床応用されるまで発展してきており、今後、再生医療を応用した様々な治療法や device が開発されていくにあたり、その先駆けとなるリサーチとなれば幸いである。

Development of new approaches to cardiovascular disease with the use of tissue regeneration

Takayoshi Ueno, Shigeru Miyagawa, Koichi Toda, Toru Kuratani, Yoshiki Sawa
Cardiovascular Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine
Tel: +81-6-6879-3151, Fax: +81-6-6879-3159, E-mail: uenotm@surg1.med.osaka-u.ac.jp

教育講演

2A-EL1

ドラッグデリバリーシステム：マテリアルの基礎と臨床応用

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
○田村　篤志

疾患の予防や治療に使用される薬剤は、少量で強い生理活性を示す化学物質（天然物や合成の低分子、生体分子など）であり、何らかの方法で体内に摂取されることでその効果を発揮する。そのような化学物質をそのまま投与、服用する機会は少なく、薬剤の効果が効率的に発揮されるようなカプセル剤や錠剤などの剤形で使用される。このような製剤の設計は、物理薬剤学や生物薬剤学の進歩だけではなく、投与方法、材料工学、医療機器など医学や工学の進歩とともに今日の形態に発展した。ドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System: DDS）は製剤設計における方法論の一つであり、「薬剤の放出制御」、「薬剤の吸収改善」、「薬剤の長寿命化」、「薬剤の標的化」を主な目的としており、非常に多くの手法が考案され、多くの医薬品に実装されている[1-4]。薬剤として使用される化合物（医薬原体）は、従来の低分子化合物に限らずペプチド、タンパク質（酵素、サイトカイン、成長因子）、核酸（アンチセンスオリゴ核酸、siRNA）など様々な物質が薬剤として利用されている。このような薬剤の変遷に伴い、DDS の方法論だけではなく DDS に使用される材料についても様々な検討が進められてきた。

DDS で使用される材料は、基礎研究では金ナノ粒子やシリカナノ粒子など金属材料、無機材料の利用が検討されているが、既存の DDS 製剤では脂質や高分子化合物（合成高分子や生体高分子）など有機材料が利用されることがほとんどである。合成高分子としては、生分解性高分子であるポリ乳酸などや、親水性高分子であるポリエチレングリコール（PEG）が代表的な材料として知られている。生分解性高分子は薬剤を徐放するための材料として徐放製剤を中心に様々な製品で使用されている（薬剤の放出制御）。PEG はタンパク質との結合体や、リポソームなどナノ粒子表面に修飾することで腎排泄の回避や血液内での滞留性、安定性を向上させる目的で使用される（薬剤の長寿命化）。

薬物キャリアとしては、合成高分子、高分子ミセルやリポソームなどのナノ粒子が有名であるが、アルブミンや抗体などのタンパク質を利用した DDS 製剤も承認されている。とくに、抗体－薬物結合体（Antibody－Drug Conjugate: ADC）は薬剤を目的の患部を標的化可能な DDS であり、現在盛んに研究開発が行われている。また本年、トランスサイレチン型家族性アミロイドーシス対する siRNA 製剤 Onpattro（Patisiran）がアメリカとヨーロッパで承認を受けたが、本製剤の承認には優れた siRNA キャリアの開発が強く関連している。本製剤では脂質ベースのナノ粒子を siRNA キャリアとして用いており、それを構成する脂質の化学構造を最適化することで非常に効果的に siRNA を作用させることに成功している。本製剤は、世界初の siRNA 製剤として注目を集めているが、材料開発が医薬品としての成功に貢献した好例であると考えている。

本講演では、材料という観点で DDS の基礎と応用を概説するとともに、演者らが研究を行っている材料そのものが薬理活性を示す新たな DDS についても触れたい。

References
[1] 潮崎 仁. ドラッグデリバリーシステム 新しい投与剤形を中心とした製剤学. 南江堂（1986）.
[2] 橋田 充. ドラッグデリバリーシステム ―創薬と治療への新たなる挑戦―. 化学同人（1995）.
[3] 田畑泰彦. ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法. メディカルドゥ（2003）.
[4] 永井恒司. ラッグデリバリーシステムの新展開 ―究極の薬物治療をめざして―. シーエムシー出版（2004）.

Drug delivery system: Principles and clinical applications of materials.

Atsushi TAMURA
Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
Tel: +81-3-5280-8022, Fax: +81-3-5280-8027, E-mail: tamura.org@tmd.ac.jp

2A-EL2

体外での 3 次元組織様構築物の創製を目指したバイオマテリアル

[1] 東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻，[2] 東北大学大学院医工学研究科治療医工学
○山本　雅哉 [1, 2]

【緒言】近年、従来の Tissue Engineering とは異なり、新たな目的でバイオマテリアルを利用して、3 次元組織様構築物を体外で創製する技術が注目されている。具体的には、再生医療や創薬を目的とした、3D プリンティング、Organs-on-a-chip、オルガノイドなどである。これらの 3 次元組織様構築物の創製は、材料加工技術や細胞生物学など、異なる分野とバイオマテリアルとの融合により実現されている。さらに、こうした融合にともない、バイオマテリアルに対して新たな展開がもたらされつつある。本講演では、われわれの研究も含め、体外での 3 次元組織様構築物の創製に関する最近のトピックスについて紹介する。

【3D プリンティング】近年、Additive Manufacturing (AM) が新たな材料加工技術として注目されている。その対象は、金属粉末のみならず、高分子、セラミックス、細胞、細胞集合体など多様である。これらの技術により、3 次元組織様構築物内の細胞や材料の立体的な分布を精緻に制御することができつつある。また、犠牲層を用いて血管網を導入する技術も開発されている。しかし、再生医療に用いる場合、3 次元組織様構築物とホストの血管とを結合させなければならない。一方、体外モデルとして創薬に用いる場合、3 次元組織様構築物を灌流培養装置などと結合させなければならない。3D プリンティングに基づき、より制御して細胞を立体的に配置することができても、従来からの課題である 3 次元組織様構築物を維持するための技術が必要である。

【Organs-on-a-chip・オルガノイド】近年、創薬において、Organs-on-a-chip やオルガノイドなどが、生体組織や臓器の機能の一部を模倣した体外モデルとして注目されている。Organs-on-a-chip の特徴は、ヒト細胞を利用できることであり、ヒト正常細胞や疾患細胞、あるいはヒト iPS 細胞由来の体細胞などが利用されている。一方、解決するべき課題もある。例えば、Organs-on-a-chip では、加工や顕微鏡観察が容易であるポリジメチルシロキサン (PDMS) が利用されているが、疎水性の薬物が収着するなどの問題がある。さらに、PDMS よりも、生体の細胞外マトリックスにより近いバイオマテリアルを用いて体外モデルを構築する技術も必要であろう。

細胞が自発的に形成するオルガノイドは、3D プリンティングや Organs-on-a-chip と比較して、より生体組織に類似の体外モデルとなりうる。オルガノイドは、単なる細胞集合体ではなく、細胞の種類、立体構築、生理的特性などが試験管内で再現された細胞組織体である。近年、Lutolf らは、腸管上皮幹細胞をポリエチレングリコールからなるハイドロゲルに包埋することによって、オルガノイド形成を誘導した。ここで重要なことは、幹細胞の増殖フェーズとオルガノイド形成のフェーズとで、材料に求められる要件が異なる点である。このため、オルガノイド形成に合わせて材料の性質が変化することができるバイオマテリアル技術が必要である。

【結言】体外での 3 次元組織様構築物の創製に関連して、今後、開発が必要となるバイオマテリアル技術について概説した。一方、再生医療においても、Scaffold-free Tissue Engineering という、最終的な 3 次元組織様構築物にはバイオマテリアルが含まれないものの、その創製には、バイオマテリアルが必要不可欠となる技術に関する研究も進められている。バイオマテリアルの新たな展開が期待される。

Biomaterials for fabricating 3-dimentional tissue-like constructs *in vitro*

Masaya Yamamoto[1,2]
[1]Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University
[2]Division of Biomedical Engineering for Diagnosis and Treatment, Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University
Tel: +81-22-795-7303, Fax: +81-22-795-7303, E-mail: masaya@material.tohoku.ac.jp

2A-EL3

承認審査から見た医療機器の開発

独立行政法人医薬品医療機器総合機構　医療機器審査第三部
○白土　治己

独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）では、医薬品の副作用等による健康被害の救済（健康被害救済）、医薬品や医療機器などの品質、有効性及び安全性の評価（承認審査）、市販後の安全性に関する情報の収集、分析、提供（安全対策）に関する業務を行っています。

承認審査は高すぎるハードルですか？
承認審査の考え方やポイントをご存じですか？
研究成果をどの時点で製品化へシフトしますか？

承認審査の内容を良く理解すれば、高いハードルの攻略法や効率の良い開発戦略が見つかるかも知れません。医療機器の承認審査においては、医療機器の基本的な性能や安全性だけでなく、その開発コンセプトや臨床的ニーズ、臨床的位置づけを踏まえたリスク・ベネフィットバランスの評価が重要となります。本講演では、これまでの審査事例を踏まえて、承認審査の考え方や留意点を解説したいと思います。また、承認審査の観点から、効率的な開発を進めるためのポイントについてもお話ししたいと思います。

Medical device development from the viewpoint of approval review

Haruki SHIRATO
Office of Medical Devices III, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)
Tel: +81-3-3506-9425, Fax: +81-3-3506-9466, E-mail: shirato-haruki@pmda.go.jp

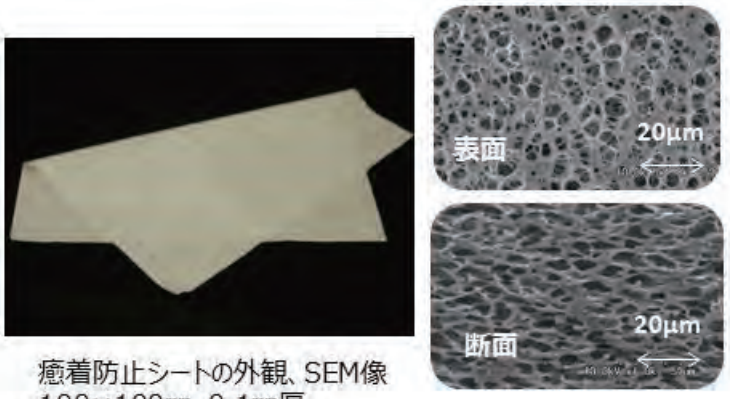
2B-01

整形外科向け癒着防止材の開発

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

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

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



癒着防止シートの外観、SEM像
100×100㎜、0.1㎜厚

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

Development of biodegradable anti-adhesion sheet for orthopedic surgery

Junichi IDE, Chigusa UWAIZUMI, Yuka YAMASHINA, Takashi YAMAMOTO
Research and Development, JMS Co., Ltd.
Tel: +81-82-243-5980, Fax: +81-82-243-5955, E-mail: j-ide@jms.cc

2B-02

医工連携による次世代型脊柱変形矯正用インプラントの開発戦略

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

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

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

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

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

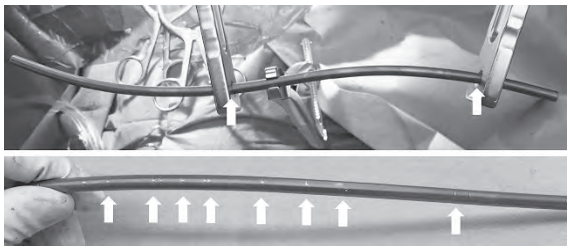


図 1. ロッド曲げ加工により生じる notch

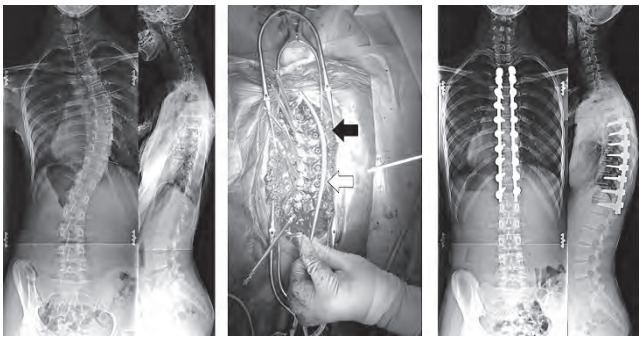


図 2. 解剖学的脊柱再建術

Next generation strategies for spinal reconstruction implants in spinal deformity

Hideki Sudo[1], Satoshi Kanai[2], Terufumi Kokabu [1], Kenta Aoyagi[3], Hao Wang[3], Norimasa Iwasaki[1], Akihiko Chiba[3]
[1]Department of Orthopaedic Surgery, Hokkaido University Hospital [2] Hokkaido University Graduate School of Information Science and Technology, [3]Institute for Materials Research, Tohoku University
Tel: +81-11-706-5934, Fax: +81-11-706-6054, E-mail: hidekisudo@yahoo.co.jp

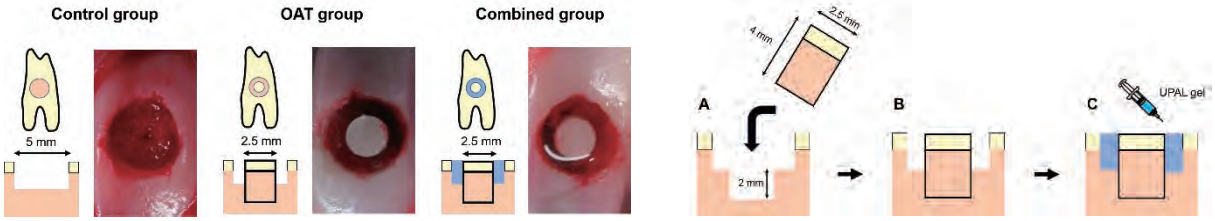
2B-03

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

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

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

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



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

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

Biomaterials: Their Development and Translational Studies

Ryosuke Hishimura[1], Tomohiro Onodera[1], Kentaro Homan [1], Woo Yong Kim[1], Masanari Hamasaki[1], Liang Xu[1], Norimasa Iwasaki[1]
[1] Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University
Tel: +81-11-706-5936, E-mail ; hishi_piero@yahoo.co.jp

2B-04

OCP/Collagen の実用化

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

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

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

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

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

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

。

Application for OCP/Collagen

Soma Kai[1], Hideshige Matsubayashi[1], Atsushi Iwai[1], Fumihiko Kajii [1,2], Hidenori Tanaka[1], Mitsuo Nishida[2], Haruo Asai[1], Shinji Kamakura[3], Keiko Matsui[4], Tadashi Kawai[4], Tetsu Takahashi[4]
[1] TOYOBO Co.,Ltd. Research and Plannig Group, Medical Business Promotion Department
[2] TOYOBO Co.,Ltd. Research Institute, Medical Device and Device Development Center
[3] Tohoku University. Graduate School of Biomedical Engneering
[4] Tohoku University. Graduate School of Dentistry

Tel: +81-6-6348-3336, Fax: +81-6-6348-3696, E-mail: Soma Kai@toyobo.jp

2B-05

リコンビナントペプチド「セルネスト」を用いた骨補填材の開発

[1] 富士フイルム株式会社バイオサイエンス&テクノロジー開発センター
○我妻　昭彦[1]，岡村　愛[1]，平塚　崇浩[1]，柿沼　千早[1]，前川　敏彦[1]，畠　賢一郎[1]

【緒言】
富士フイルム株式会社ではⅠ型コラーゲンの配列に由来するリコンビナントペプチド「セルネスト」を開発し、その優れた細胞接着性を活かしバイオマテリアルとしての可能性を追求してきた。その結果、セルネストの活用法の一つとして、骨補填材としての有用性が示唆されており、顆粒状を始めとして様々な形態において骨補填材となり得ることが分かってきた。本発表ではセルネストをスポンジ状の形態を持つ顆粒に製した歯科用の骨補填材 FBG（FUJI BONE GRAFT）の安全性試験について発表する。
FBG は医療機器であることから ISO10993 に則った試験が必要である。また、上下顎骨に埋植する材料としての使用を意図しており、埋植材料であることから生物学的安全性試験の考え方に則り、細胞毒性、感作性、刺激性、急性毒性、遺伝毒性、埋植試験を実施した。また、蛋白性の新規バイオマテリアルを使用した医療機器となることから、更に慢性毒性、がん原性、発生生殖毒性、免疫原性に関する試験について考慮する必要がある。本試験では特に慢性毒性及びがん原性に関する試験及び考察の結果を報告する。
【実験】
イヌの左右下顎歯（第三小臼歯、P3）の遠心根のみを抜歯後、抜歯窩に FBG の適用（コラーゲン膜あり）及び抜歯のみ（非適用、コラーゲン膜あり）を反対側に設定し、抜歯・適用後 1，3 及び 6 カ月に歯槽骨の形態比較を行う有効性試験を行うと同時に、各群に左右下顎第三小臼歯の抜歯のみ（非適応、コラーゲン膜無し）及び 6 カ月群に無処置（非抜歯）を設定し、全例について安全性に関連する比較検査を実施した。試験項目は適用部位及び主要組織に対する病理組織学的検査、血液生化学検査、血液検査、尿検査を行った。
【結果と考察】
抜歯・適用部位の病理組織学的検査では、抜歯窩において好中球浸潤、リンパ球浸潤、形質細胞浸潤、マクロファージ浸潤、線維化、血管新生あるいは出血、新生骨、新生骨面の骨芽細胞及び新生骨の骨梁の肥厚が各群の FBG の適用部並びに抜歯のみの部位にそれぞれ認められ、発現の程度は同等であった。FBG 適用部位における被験物質の残存は、経時的に漸減する傾向を示し、6 カ月群では 1 例のみごく僅かな残存を認めたが、その他は全て消失していた。
一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検所見、抜歯・適用部位以外の病理組織学的検査に被験物質適用に起因すると考えられる変化は認められなかった。
以上より、安全性関連検査で FBG 適用に起因する変化は認められないものと結論した。また、がん原性については本品は単回投与であり、移植 6 ヶ月後にはほぼ吸収されており、病理学的検査の結果、前がん病変を含め異常は認められなかったため、がん原性試験を実施する必要はないものと考えられた。

Development of Bone Graft Material Using Recombinant Peptide “Cellnest”

Akihiko Azuma[1], Ai Okamura[1], Takahiro Hiratsuka[1], Chihaya Kakinuma[1], Toshihiko Maekawa[1], Kenichiro Hata[1]
[1]Bioscience & Technology Development Center, FUJIFILM Corporation.
Tel: +81-465-85-4362, Fax: +81-465-86-1019, E-mail: akihiko.azuma@fujifilm.com

2B-06

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

[1]中部大学生命健康科学部, [2]Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, Italy
○山口　誠二[1], 高玉　博朗[1], Sara Ferraris[2], Enrica Verné[2], Francesco Baino[2], Marta Miola[2], Veronica Peretti[2], Silvia Spriano[2]

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

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

【実験】生体活性を有する SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5-B_2O_3-Al_2O_3 ガラス（SBA2）、NaOH-HCl-加熱処理を施した Ti 金属(Ti(A-HC-H))、NaOH-加熱処理、NaOH-$CaCl_2$-加熱-温水処理及び HF-H_2O_2 処理を施した Ti-6Al-4V 合金（それぞれ、Ti64(A-H)、Ti64(A-Ca-H-W)、Ti64(HF-H_2O_2)）試料を既知の手法に従って作製した。これらの試料の一部を SBF に 30 分～28 日間浸漬した。処理後及び SBF 浸漬後の試料を薄膜 XRD、Raman、SEM、XPS、ゼータ電位測定により分析した。

【結果と考察】XRD 及び Raman 分析によると、いずれの試料においても検出される結晶相の種類に差はなかったが、Ti64(HF-H_2O_2)に形成された約 400nm の薄い表面層は Raman 分析のみにより検出可能であった。これらの結果はナノメートルスケールの薄層の結晶構造の同定には Raman 分析が有用であることを示唆している。SBF 中での Ca 及び P の吸着挙動を XPS で分析したところ、試料間でこの吸着順序が異なることが明らかになった。これらはいずれも長期間浸漬後にアパタイトを形成した。また、希釈した SBF 中における試料のゼータ電位を測定したところ、図 1 に見られるように SBA2 の表面電位が浸漬直後から急激に上昇した。これは、SBA2 表面における溶解及びイオン吸着反応が速やかに進んでいることを示している。

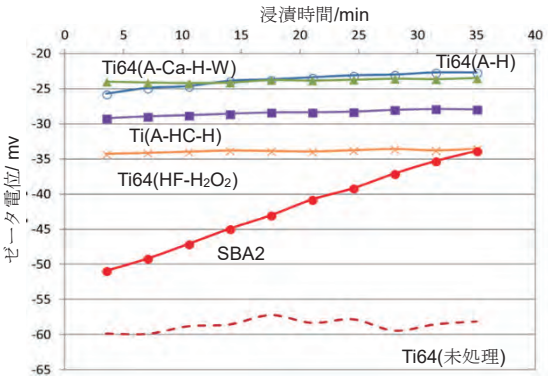


図 1　生体活性ガラス及び生体活性 Ti 金属/合金の希釈 SBF 中におけるゼータ電位の浸漬時間による変化

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

【謝辞】本研究は MAECI-Italy の助成を受けたものです。

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

Seiji Yamaguchi[1] Hiroaki Takadama[1], Sara Ferraris[2], Enrica Verné[2], Francesco Baino[2], Marta Miola[2], Veronic. Peretti[2], Silvia Spriano[2]
[1]Department of Biomedical Sciences, Chubu University, Japan
[2] Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, Italy
Tel: +81-568-51-6420, Fax: +81-568-51-5370, E-mail: sy-esi@isc.chubu.ac.jp

2B-07

医療技術の QOL デザイン

[1] 京都大学工学研究科
○富田　直秀 [1]

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

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

参考論文・web：

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

参考動画：

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

QOL (quality of life) designing for Medical Technology

Naohide Tomita[1]
[1]Graduated school of Engineering, Kyoto University
Tel: +81-75-383-3639, Fax: +81-75-383-3642, E-mail: tomita.naohide.5c@kyoto-u.ac.jp

2B-08

リン酸オクタカルシウムが破骨細胞－骨芽細胞間クロストークに与える効果

[1] 東北大学大学院歯学研究科　顎口腔機能創建学分野，[2] 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，[3] 東北大学大学院歯学研究科　口腔システム補綴学分野
○鈴木　治[1]，塩飽　由香利[1,2]，土屋　香織[1]，肖　凌浩[1,3]，佐々木　啓一[3]

【緒言】

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

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

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

【実験】

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

【結果と考察】

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

【参考文献】

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

Effect of octacalcium phosphate on the osteoclast-osteoblast crosstalk

Osamu Suzuki[1], Yukari Shiwaku[1,2], Kaori Tsuchiya[1], Linghao Xiao[3], Keiichi Sasaki[3]
[1]Division of Craniofacial Function Engineering, Tohoku University Graduate School of Dentistry [2]Liaison Center for Innovative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry [3]Division of Advanced Prosthetic Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry
E-mail: suzuki-o@m.tohoku.ac.jp

2B-09

生体吸収性マグネシウム合金の分解に伴う空孔形成挙動評価手法開発

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

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

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

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

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

【実験】試料として 3mmφ×5mm の純 Mg（99.9%）を使用した。全面を湿式研磨後、EOG により滅菌した。疑似体液としては、ヒト血漿組成に基づき開発された Eagle 最小必須培地（E-MEM）を採用し、牛胎児血清を 10%添加して用いた。ヒト組織におけるガス拡散阻害を模擬するために、培地に種々の濃度の増粘剤を添加し、37°C、5%CO_2 下で浸漬試験を実施した。一定期間経過後の空孔形成量をマイクロ X 線 CT 観察により求めた。対象として増粘剤を添加しない培地中への浸漬も実施し、溶液中に溶出した Mg イオンを定量した。浸漬試験終了後、試料を回収し、クロム酸洗浄後の重量減から、分解量を求めた。

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

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

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

Akiko Yamamoto[1], Akemi Kikuta[1], Fillip Witkowski[2], and Wojciech Święszkowski[2]
[1]Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Sciences, [2]Faculty of Materials Science and Engineering, Warsaw University of Technology
Tel: +81-29-860-4169, Fax: +81-29-860-4626, E-mail: yamamoto.akiko@nims.go.jp

2B-10

気孔径が炭酸アパタイトハニカムの骨伝導性に及ぼす影響

[1]九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野，[2]福岡歯科大学生体工学分野，[3]産総研四国センター
○石川　邦夫[1]，林　幸壱朗[1]，土谷 享[1]，都留　寛治[1,2]，杉浦　悠紀[1,3]

【緒言】

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

【実験】

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

家兎脛骨にφ７mmの骨欠損を調製し、850-1000μmの炭酸アパタイトハニカムおよび炭酸アパタイト緻密体で骨欠損部を再建し、埋入２週および４週目に試料を周囲組織と一塊に摘出、HE 染色像を検索した。

【結果と考察】

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

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

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

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

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

Effects of Pore Size on Osteoconductivity of Carbonate Apatite Honeycomb

Kunio Ishikawa[1], Koichiro Hayashi[1], Akira Tuchiya [2], Kanji Tsuru[1,2], Yuki Sugiura [1,3]
[1]Department of Biomaterials, Faculty of Dental Science, Kyushu University, [2]Department of Dental Engineering, Fukuoka College of Dentistry, [3]Shikoku Center, AIST.
Tel: +81-92-642-6344, Fax: +81-92-642-6348, E-mail: ishikawa@dent.kyushu-u.ac.jp

2B-11

The enhanced osseointegration of a novel implant antibacterial coating

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

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

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

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

Jiang Wu[1, 2], Huifang Ren[1], Yicheng Cheng[1]
[1] School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, China
[2] Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan
Tel: +81-82-257-5648, Fax: +81-82-257-5649, E-mail: wujiang@fmmu.edu.cn

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

[1]Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan, [2]Master's School of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan
○Babita Shashni[1] and Yukio Nagasaki[1,2]

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

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

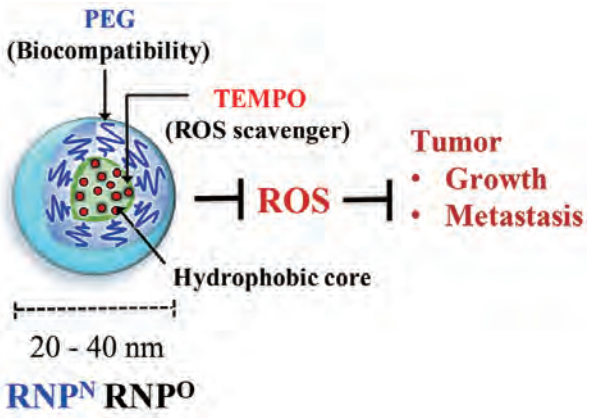


Figure 1. Graphical abstract

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

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

○Babita Shashni[1] and Yukio Nagasaki[1,2]

[1]Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan
[2]Master's School of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan
Tel: +81-029-853-5936 Fax: +81-029-853-5749
E-mail: shashni@ims.tsukuba.ac.jp, happyhusband@nagalabo.jp

2B-13

リポソーム内部におけるポリマー合成による機能性カプセルの開発

慶應義塾大学大学院 理工学研究科
○杉本　光，福井　有香，藤本　啓二

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

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

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

Creation of Functional Capsules by Polymer Synthesis inside a Liposome

Hikaru SUGIMOTO, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO
Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: 045-566-1580, Fax: 045-566-1551, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

2B-14

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

[1] 東京大学大学院工学系研究科, [2] 川崎市産業振興財団, ナノ医療イノベーションセンター(iCONM), [3] 東京医科歯科大学, [4] 東京大学政策ビジョン研究センター
○内田　智士[1,2], 吉永　直人[1,2], 長田　健介[1], 位高　啓史[3], Horacio Cabral[1], 片岡　一則[1,4]

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

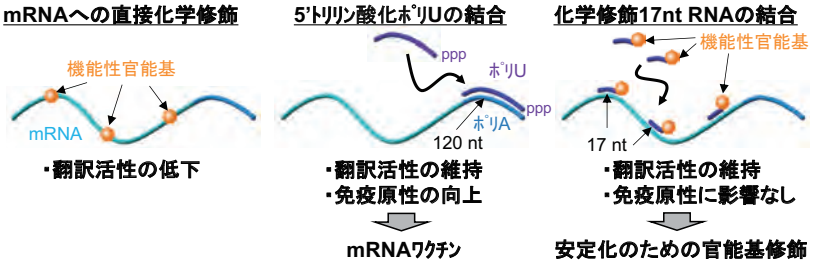


図　化学修飾相補鎖RNAを用いたmRNAの機能化

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

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

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

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

Stabilization of mRNA polyplex micelles using cholesterol-installed complementary RNA

Satoshi Uchida[1,2], Naoto Yoshinaga[1,2], Kensuke Osada[1], Keiji Itaka[3] Horacio Cabral[1], Kazunori Kataoka[1,4]
[1]Graduate School of Engineering, The University of Tokyo [2]Kawasaki Institute of Industrial Promotion [3]Tokyo Medical and Dental University [4]Policy Alternatives Research Institute, The University of Tokyo
Tel: +81-3-5841-7138, Fax: +81-3-5841-7139, E-mail: suchida@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

2B-15

生体膜ハイブリッドナノ粒子の構築とバイオ機能評価

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻
○名倉 百華・澤田 晋一・佐々木 善浩・秋吉 一成

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

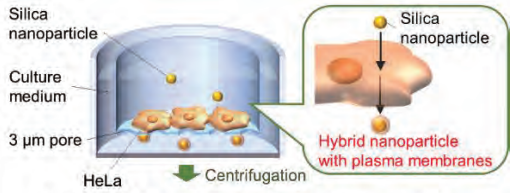


Figure 1. Production of hybrid nanoparticle with plasma membranes via centrifugation

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

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

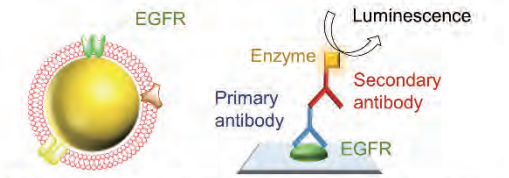


Figure 2. Schematic illustration of western blotting and detection of EGFR on the hybrid nanoparticles.

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

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

Preparation of hybrid nanoparticles with biomembrane for potential biomedical application

Momoka NAKURA, Shin-ichi SAWADA, Yoshihiro SASAKI, Kazunari AKIYOSHI
Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University
Tel: +81-075-383-2589, Fax: +81-075-383-2590, E-mail: nakura.momoka.35x@st.kyoto-u.ac.jp

2B-16

生体接着型オプトエレクトロニクスによる局所光線力学療法

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

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

【実験】グラビアコーターを用いて、PETフィルム上に水溶性犠牲層となるpolyvinyl alcohol (PVA)を製膜した。次に、PDMS (base:cure=10:1)を希釈後、PVA層の上に製膜して熱硬化させた(80˚C, 12 h)。PVA/PDMS二層膜をPETフィルムから剥離し、水中にてPVA層を溶解することで自己支持性PDMSナノ薄膜を得た。このPDMSナノ薄膜をドーパミン溶液(2 mg/mL in 10 mM Tris buffer, pH8.5, O_2 bubbling, 24 h)に浸漬することでPDAをナノ薄膜表面に修飾した。この時、得られたナノ薄膜の接着エネルギーを引張試験機を利用したタックセパレーション試験にて評価した。さらに、PDA修飾したPDMSナノ薄膜(膜厚約650 nm)を用いて、近距離無線(NFC)発光式の赤色および緑色のLEDチップ(7.0 × 11.0 × 0.8 mm, < 100 μW/cm^2)をサンドウィッチ状に封止し、生体組織への接着性を有する発光デバイスを作製した。背部皮内に腫瘍細胞を移植した担がんモデルマウスを作製し、PDA修飾PDMSナノ薄膜の接着性を利用することで発光デバイスを皮下に貼付した。光増感剤投与下(Photofrin, 8 mg/kg, 2回)において、腫瘍に対して10日間連続で光照射した際の腫瘍サイズの変化を経時的に測定し、14 日後における病巣部の組織切片像より治療後の腫瘍形態を評価した。

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

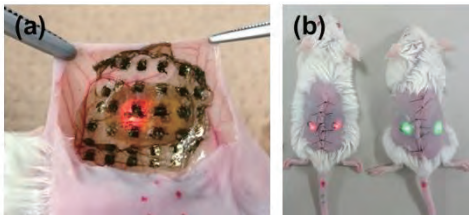


Figure 1. (a) A subcutaneously implanted LED device. i.e., Dots were printed for visualizing the nanosheet. (b) Wirelessly-powered red and green LEDs in mice (Reproduced from Ref. 1).

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

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

Local Photodynamic Therapy by Bio-Adhesive Optoelectronics

Toshinori Fujie[1,2], Kento Yamagishi[3], Kirino Izumi[4], Isao Takahashi[3], Hizuru Amano[5], Shinji Takeoka[3], Yuji Morimoto[6]
[1]Waseda Institute for Advanced Study, Waseda University, [2]Japan Science and Technology Agency, PRESTO, [3]Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, [4]Graduate School of Medicine, Kyoto University, [5]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, [6]Department of Physiology, National Defense Medical College
Tel: +81-3-5369-7324, Fax: +81-3-5369-7324, E-mail: t.fujie@aoni.waseda.jp

2B-17

ミトコンドリア強化幹細胞（MITO Cell)を用いた細胞移植療法の検証

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

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

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

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

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

Yuma Yamada[1], Jiro Abe[2], Daisuke Sasaki[2], Atsuhito Takeda[2], Hideyoshi Harashima[1]
[1] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University [2]Department of Pediatrics, Hokkaido University Hospital
Tel: +81-11-706-3735, Fax: +81-11-706-3734, E-mail: u-ma@pharm.hokudai.ac.jp

2B-18

ペプチド修飾脱細胞小口径血管の組織再生プロセスと開存性

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

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



Figure 1. Peptide-modified small-diameter acellular graft

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

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

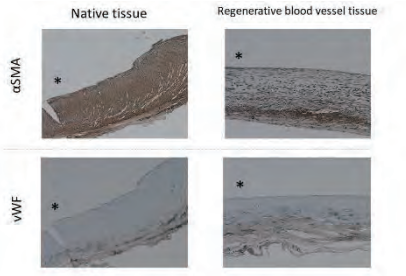


Figure 2 Maturation of regenerative blood vessel tissue after transplantation for 12 months. *: luminal side

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

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

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

Atsushi Mahara[1], Kentaro Kojima[1, 2], Yoshiaki Hirano[2], Tetsuji Yamaoka[1]
[1]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
[2] Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University
Tel: +81-6-6833-5012 x2637, Fax: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

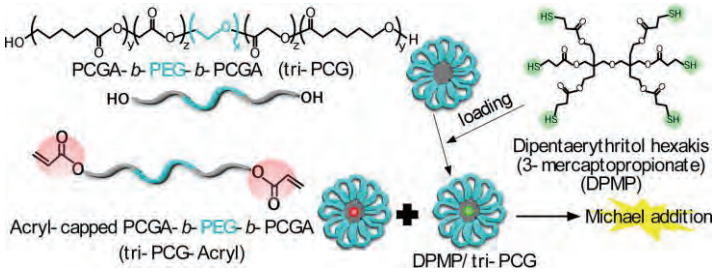
2B-19

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

[1] 関西大 ORDIST，[2] 関西大化学生命工，[3] 大阪医大，[4] 関西大医工薬連携研究セ
○能﨑優太 [1]，髙井宏樹 [2]，藤原壮一郎 [2]，伊井正明 [3]，打田裕明 [3]，根本慎太郎 [3]，葛谷明紀 [2,4]，大矢裕一 [2,4]

【緒言】

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



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

【実験】

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

【結果と考察】

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

【参考文献】

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

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

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

2B-20

生分解性の異なるシルクゲル注入による心筋ネガティブリモデリングの抑制

国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部
○神戸　裕介，山岡　哲二

【緒言】
心筋梗塞（MI）に対するゲル注入治療法による心筋線維化と心肥大の悪循環（心筋ネガティブリモデリング）の抑制は，注入されたゲルが左心室壁を厚くし，心筋にかかる力学負荷を軽減することによると考えられている[1]．しかし，非生分解性のゲルを注入した場合，左室壁は厚くなるものの心機能が改善しないとの報告があり[2,3]，本療法の治療メカニズムは不明なままである．我々は，炎症反応や再生組織による置換に関与する，ゲルの生分解性（残存期間）に着目している．
家蚕が産生するシルクフィブロイン（SF）は，水溶液状態を出発点として，力学刺激などにより物理ゲルを形成する．SF ゲルは，その濃度により，数 Pa から 6 MPa もの広範囲に渡る圧縮弾性率を示すため[4]，左心室壁厚を維持し得る力学強度を有している．また，*in vivo* での SF ゲルの生分解は血管内皮細胞（EC）に先導される形でゲルに浸潤するマクロファージや線維芽細胞に依ることが分かっている[5]．本研究では，SF ゲルの生分解性を改変するため，ゲル内への EC の浸潤を促進するペプチドを作製し，これで SF ゲルを修飾した．ペプチド修飾 SF ゲル（SF+Pep ゲル）は SF ゲルに比べて短い生分解性を有していたため，両ゲルを MI モデルラットに適用し，ゲルの生分解性が本療法の治療効果に及ぼす影響を検討した．

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

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

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

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

Yusuke Kambe and Tetsuji Yamaoka
Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
Tel: +81-6-6833-5012 (ext2637), Fax: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

2B-21

脱細胞化小口径動脈グラフトの作製と in vivo 評価

[1]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所　物質医工学分野
[2]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所　脱細胞化再生医療材料学研究部門
[3]物質・材料研究機構　国際ナノアーキテクトニクス研究拠点
○橋本　良秀[1,2]，山下　暁立[2]，張　永巍[1,2]，舩本　誠一[1,2,3]，岸田　晶夫[1]

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

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

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

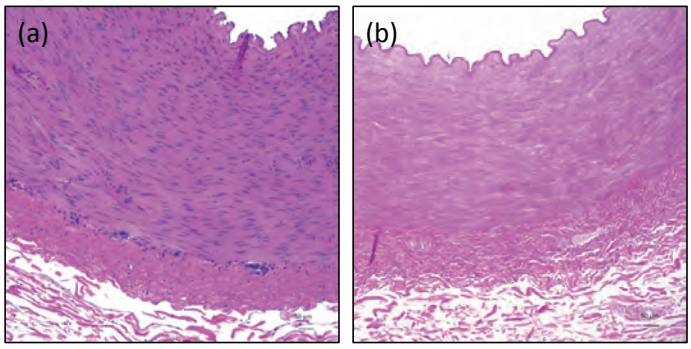


Figure 1 H-E stained images of small-diameter vascular grafts before (a) and after (b) decellularization.

Preparation and characterization of decellularized small-diameter vascular grafts

Yoshihide HASHIMOTO[1,2], Akitatsu YAMASHITA[2], Yongwei ZHANG [1,2], Seiichi FUNAMOTO[1,2,3], Akio KISHIDA[1]
[1]Department of Material-Based Medical Engineering, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [2]Division of Acellular Tissue and Regenerative Medical Materials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [3]International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science
Tel: +81-3-5280-8029, Fax: +81-3-5280-8005, E-mail: hashimoto.atrm@tmd.ac.jp

2B-22

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

[1]株式会社日本医療機器技研，[2]物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点，[3]熊本大学 大学院先端科学研究部
○佐々木　誠[1]，山本　玲子[2]，新留　琢郎[3]

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

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

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

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

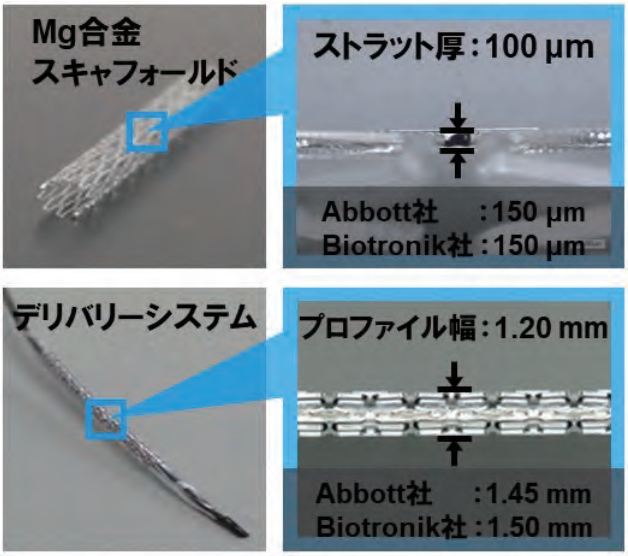


図 1　Mg 合金スキャフォールド

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

Magnesium alloy-based bioresorbable scaffold for percutaneous coronary intervention

Makoto Sasaki[1], Akiko Yamamoto[2], Takuro Niidome[3]
[1] Japan Medical Device Technology Co., Ltd.
[2] Research Center for Functional Materials National Insititute for Materials Science
[3] Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University
Tel: +81-96-285-8278, Fax: +81-96-285-8279, E-mail: m.sasaki@jmdt.co.jp

2B-23

組織工学材料を指向したシルクフィブロイン／生分解性ポリマー混合不織布の創製

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

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

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

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

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

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

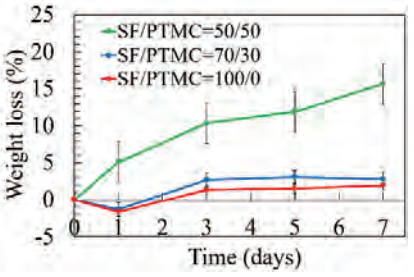


Fig. 1. Weight loss ratio of enzymatic degradation of SF/PTMC composite sheets.

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

Natsui Hattori[1], Kaori Numata[1], Toshiharu Murakami[2], Shuhei Tara[3], Yasumoto Nakazawa[1]
[1]Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan, Tel & Fax: +81-42-388-7612, E-mail: yasumoto@cc.tuat.ac.jp
[2]Graduate School of Agrivulture, Tokyo University of Agriculture and Technology
[3]Department of Cardiovascular Medicine, Nippon Medical School

「文部科学省における医療技術開発の支援及びナノテクノロジー・材料科学技術の推進」

文部科学省研究振興局ライフサイエンス課　　砂 真一郎
文部科学省研究振興局参事官（ナノテクノロジー・物質・材料担当）付　　村上 望

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

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

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

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

2C-S3-2

医療機器研究開発とバイオマテリアル

国立研究開発法人日本医療研究開発機構産学連携部
仲山賢一

日本医療研究開発機構の産学連携部の医療機器研究開発支援は、「オールジャパンでの医療機器開発」として、基礎研究・応用研究・非臨床研究・臨床研究および治験を一貫して支援することを特徴としている。
その内容は、新規医療機器を開発するための新しい原理の証明やプロトタイプ製作のような基礎的なフェーズの研究（文部科学省医療分野研究成果展開事業・先端計測分析技術・機器開発プログラム）から、新しい医療機器の薬事申請を目的とした臨床研究・医師主導治験を行う臨床フェーズの研究（厚生労働省：医療機器開発推進研究事業、経済産業省：医工連携事業化推進事業）まで、幅広い研究ステージを支援している。
さらに医療機器の研究開発は、医療に関する知識や経験、ニーズを必要とし、また薬事承認制度や保険制度などの独特の規制の下で開発を行う必要があるという点で産業用機械の開発とは大きく異なっている。このような異業種連携が必須となる医療機器開発の場を整備するために、日本医療研究開発機構は厚生労働省事業「国産医療機器創出促進基盤整備等事業」を推進している。この事業においては、医療機器開発に携わる人材を医療現場で育成することを通じて、医師等との交流の場を確保して高度な医療ニーズを見出し、その医療ニーズに的確に対応した医療機器の開発を推進することを目指している。また、薬事申請・事業化・知財化戦略について専門家からの助言を受けたいという企業には、医療機器開発支援ネットワークを通じた「伴走コンサルティング」も実施している。
本講演では、これらの支援事業について紹介するとともに、医療機器の研究開発において重要な役割を持つバイオマテリアルに関するいくつかの研究を紹介する。

2C-S3-3

医療技術の高度化に向けたバイオマテリアルデザインとその製品化

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

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

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

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

Biomaterials Design for Creating Innovative Medical Technologies

Toshihiro Kasuga
Division of Advanced Ceramics, Department of Life Science and Applied Chemistry,
Nagoya Institute of Technology
Tel&Fax: +81-52-735-5288, E-mail: kasuga.toshihiro@nitech.ac.jp

2C-S3-4

医歯薬工連携研究に於けるハードルと夢～生体材料工学研究者の立場から

日本学術会議連携会員
バイオマテリアル学会常任理事
大阪大学大学院工学研究科・生体材料学領域
中野貴由

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

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

2C-01

PMEA/水界面の微細構造形成における分子量効果と生体親和性との相関

[1] 九州大学大学院工学府, [2] 九州大学先導物質化学研究所, [3] 山形大学有機材料システム研究推進本部
○馬渡　なみ[1], 園田　敏貴[1], 村上　大樹[1, 2], 田中　賢[1, 2, 3]

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

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

【結果と考察】PBS 中における各分子量の PMEA の界面形態観察を行った結果、PMEA19k, 30k, 44k ではおおよそ同程度のサイズの界面構造が観測されたのに対し、183k では凸部のサイズが明らかに大きい様子が観察された(**Fig. 1**)。また、フィブリノーゲンの吸着量は異なる分子量間で大きな差は見られなかったが、γ鎖の露出度および血小板粘着数では PMEA183 のみ有意に高い結果が得られた。一方、フィブロネクチンの吸着量・細胞接着部位露出度および細胞初期接着数は、PMEA183 のみ有意に低く、前述の抗血栓性評価とは対照的な結果を示した。これらの結果は、微細構造の凹凸サイズの違いと、微細構造上でのタンパク質の特異的吸着挙動が大きく影響していることが考えられる。発表では、微細構造上でのタンパク質の特異的吸着および変性挙動の詳細と合わせて、微細構造と細胞接着選択性との関係の定量的な考察について報告する。

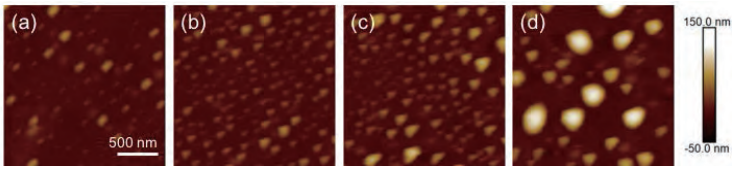


Fig. 1 Topography of PMEA/PBS interface. (a)PMEA19k, (b)PMEA30k, (c) PMEA44k, and (d)PMEA183k

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

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

Nami Mawatari[1], Toshiki Sonoda[1], Daiki Murakami[2], Masaru Tanaka[1]
[1]Graduate School of Engineering, Kyushu University, [2]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, [3]Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University
[1]Tel/Fax: +81-92-802-6238, E-mail: masaru_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

2C-02

Proliferation and Organization of Encapsulated Cells in Phospholipid Polymer Hydrogel Networks

[1]Department of Bioengineering, [2]Department of Materials Engineering, School of Engineering, the University of Tokyo
○Ren ZHANG[1], Tomohiro KONNO[1], Yuuki INOUE[2], Kazuhiko ISHIHARA[1,2]

【Introduction】

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

【Experimental】

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

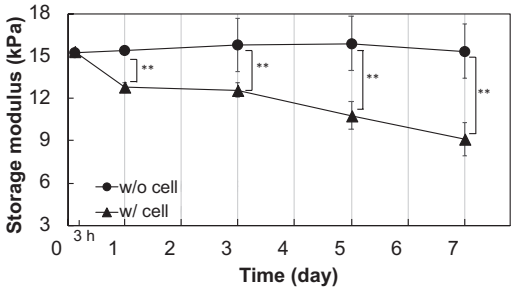


Fig. 1 The storage modulus variation with laden cells. **: $p<0.01$. (The initial cell density is 10^6 cells/mL.)

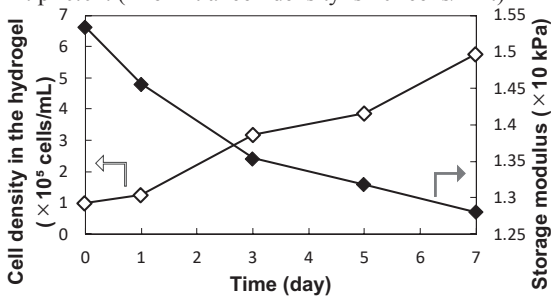


Fig. 2 The variation of storage modulus of the hydrogel with cell density of laden cells. (The initial cell density is 5×10^5 cells/mL.)

【Results and discussions】

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

Proliferation and Organization of Encapsulated Cells in Phospholipid Polymer Hydrogel Networks
Ren ZHANG[1], Tomohiro KONNO[1], Yuuki INOUE[2], Kazuhiko ISHIHARA[1,2]
[1]Department of Bioengineering, [2]Department of Materials Engineering, School of Engineering, the University of Tokyo
Tel: +81-3-5841-7128, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: jun@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

2C-03

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

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

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

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

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

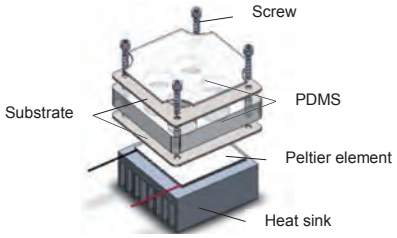


Figure 1 Metallic cell culture device controlling temperature of culture surface

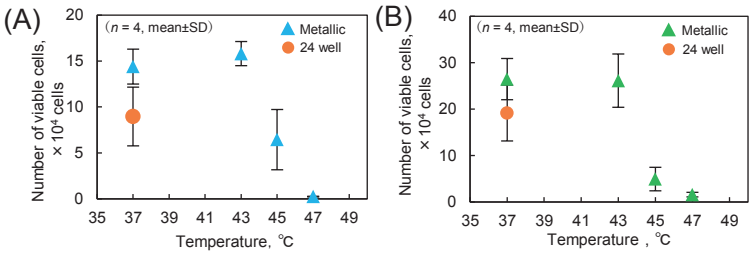


Figure 2 Relationship between number of viable cells and temperature of thermal stimulation 1 day after heating for 2 h. (A) normal cells (NHDF), (B) cancer cells (MCF-7)

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

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

Yuta IDA[1], Yuta KURASHINA[2], Shogo MIYATA[3], Kenjiro TAKEMURA[3], Jun KOMOTORI[3]
[1] School of Integrated Design Engineering, Graduate School of Science and Technology, Keio University, [2] Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, [3] Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University
Tel: +81-45-563-1151, Fax: +81-45-563-1151, E-mail: yuta.ida29@keio.jp

2C-04

肝臓細胞機能を向上させるための硫酸化ポリロタキサン表面の設計

[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
○有坂　慶紀[1]，由井　伸彦[1]

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

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

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

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

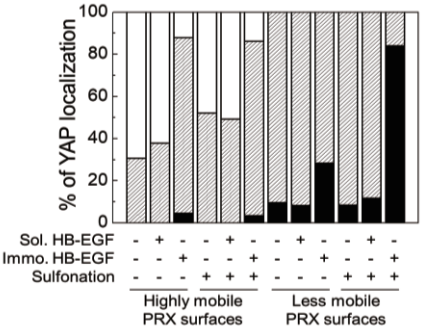


Figure 1. Proportion of nuclear YAP localization (filled bars), both nuclear and cytoplasmic YAP localization (hatched bars) or cytoplasmic YAP (opened bars) in HepG2 cells on each surface.

[1] *Soft Matter* **2012**, 8 (20), 5477-5485. [2] *Adv Healthcare Mater* **2015**, 4 (2), 215-222. [3] *J Biomater Sci, Polym Ed* 2017, 28 (10-12), 974-985.

Design of sulfonated polyrotaxane surfaces to improve hepatocyte-functions

Yoshinori Arisaka[1], Nobuhiko Yui[1]
[1]Department of Organic biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8022, Fax: +81-3-5280-8027, E-mail: arisaka.org@tmd.ac.jp

2C-05

傾斜ジブロックポリマーブラシ構造が細胞接着と移動に与える影響

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

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

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

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

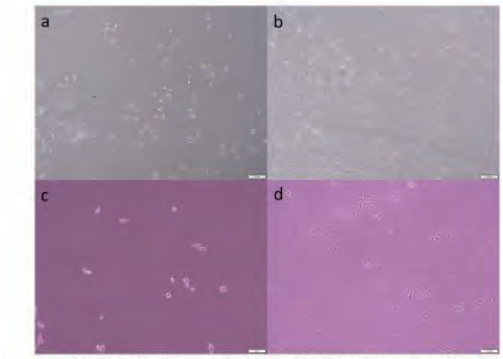


Fig.1 (a) MCF-10A at short poly(AEMA) (b) MCF-10A at long poly(AEMA) (c) MCF-7 at short poly(AEMA) (d) MCF-7 at long poly(AEMA) (scale bar 100 μm)

【参考文献】
[1] T. Azuma, *et al., ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8, 10710-10716

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

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

2C-06

可視光照射で単一細胞剥離を制御する高分子ナノ薄膜修飾基材の開発

早稲田大学大学院　先進理工学研究科
○山本　光哉，今任　景一，武田　直也

【緒言】

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

【実験】

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

【結果と考察】

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

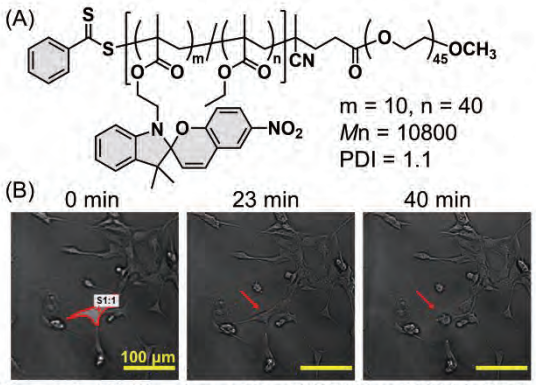


Figure 1. (A) Structure of the P(SPMA-*r*-EMA)-*b*-PEG. (B) Single cell detachment by visible light stimulus.

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

Mitsuya YAMAMOTO, Keiichi IMATO, Naoya TAKEDA
Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University (TWIns)
Tel: +81-3-5369-7323, Fax: +81-3-5369-7323, E-mail: ntakeda@waseda.jp

2C-07

ポリマーを用いたバイオ由来素材の組織化と微細構造の制御

[1] 慶應義塾大学大学院理工学研究科
○南　裕之[1]，福井　有香[1]，藤本　啓二[1]

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

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

【結果と考察】分子量が 12000 の PNPA に対し、全活性エステル基の約 23%に DOPA を固定化したポリマー(PNPA-D-COOH)を作製した。また、粒径約 200 nm の Lipo に CHI を単層吸着(35 ng/cm^{-2})させることによって Lipo-CHI を作製した。Lipo-CHI の表面電位は pH 3.0 では+45.4 mV、pH 7.4 では+1.82 mV となった。pH 3.0 で PNPA-D-COOH と Lipo-CHI を混合したところ、密に充填された組織体が得られた。一方、pH 7.4 にして PNPA-D-COOH との静電相互作用を弱めたところ、Fig. 1(a)に示すようなポーラス組織体が得られた。さらに、このポーラス組織体を崩壊させて(クラスター化)、pH を変化させることで集積状態を調節し、ポアサイズを変化させることができた。また、カテコール部をキノン架橋することにより、基板から剥離したフリースタンディングな Lipo 由来組織体が得られた。
同様に、細胞由来の Cell-CHI と PNPA-D-COOH を混合し、pH によって Cell-CHI の集積状態を調節することができた。pH 7.4 では細胞スケールの凹凸構造を有する組織体(Fig. 1(b))が得られ、pH 3.0 にするとネットワーク化した組織体が得られた。さらに、この組織体をキノン架橋することで、フリースタンディングな細胞由来組織体を得ることができた。

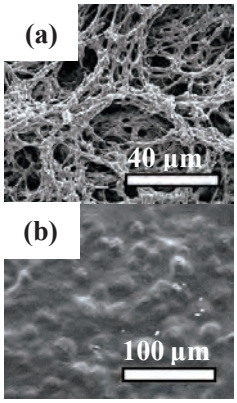


Fig.1 Bio-scaffolds assembled from (a) Lipo-CHI and (b) Cell-CHI with the assistance of PNPA-D-COOH.

Construction of bio-scaffolds by polymer-assisted assembly from cells or liposomes
Hiroyuki Minami[1], Yuuka Fukui[1], Keiji Fujimoto[1]
[1] Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: 045-566-1839, Fax: 045-566-1839, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

2C-08

ムチンのポリマーグラフト化とバイオコーティング材料への応用

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

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

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

【結果と考察】未処理のムチン($Mucin_0$)と糖鎖トリミング率 70%のムチン($Mucin_{70}$)への iniferter 基の導入は DMT-MM 量によって調節できた。以下では、$Mucin_0$-*i* (導入率:18.0%)と $Mucin_{70}$-*i* (導入率:49.8%)を用いて HEMA のグラフト重合を行った。得られた Mucin-*g*-PHEMA は IBUNa 濃度に応答して溶解状態が変化し、透析によって IBUNa を除去すると粒子が生成した。この際、グラフト化ムチンの濃度、PHEMA の鎖長と密度などによって粒径を調節することができた。Mucin-*g*-PHEMA 粒子の表面電位は負を示し、ムチンが粒子表面を覆って分散安定効果を発現していると考えられる。次に、粒子分散液をコーティングしたところ、乾燥とともに粒子間で会合・融着が進み、粒子が密に充填されて表面を均一に覆うことがわかった。ムチンのみではコーティング層は形成されなかった。接触角を測定したところ、コーティングにより基材表面は親水化した。また、糖鎖のトリミング率が高いほど、コーティング膜の接触角が高くなった。さらに、基板の特性によってムチンの分布が変化することがわかった。次に、後処理として熱処理を施したところ、基板への接着性と耐水性を向上させることができた。以上、種々の生物学的機能を有するバイオ素材であるムチンにポリマーグラフト鎖を導入することによって、粒子など構造形成能とともにコーティング能を付与することができた。

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

Hikaru TOKUSEI, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO
Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: 045-556-1580, Fax: 045-566-1551, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

2C-09

生分解性ナノゲル架橋ポーラスゲル材料の設計と機能評価

京都大学大学院工学研究科
○廣瀬　諒，澤田　晋一，向井　貞篤，佐々木　善浩，秋吉　一成

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

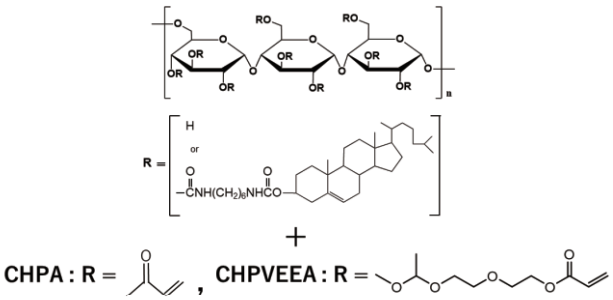


Fig.1 Chemical structure of CHPA and CHPVEEA

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

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

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

Design and function of nanogel crosslinked porous gel with biodegradability

Ryo HIROSE, Shin-ichi SAWADA, Sada-atsu MUKAI, Yoshihiro SASAKI, Kazunari AKIYOSHI
Graduate School of Engineering Kyoto University, Department of Polymer Chemistry
Tel: +81-075-383-2589, Fax: +81-075-383-2590, E-mail: hirose.ryo.27x@st.kyoto-u.ac.jp

2C-10

細胞表面の混在分子が細胞間相互作用へ及ぼす影響

京都大学　ウイルス・再生医科学研究所
○有馬　祐介，磯部　潤

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

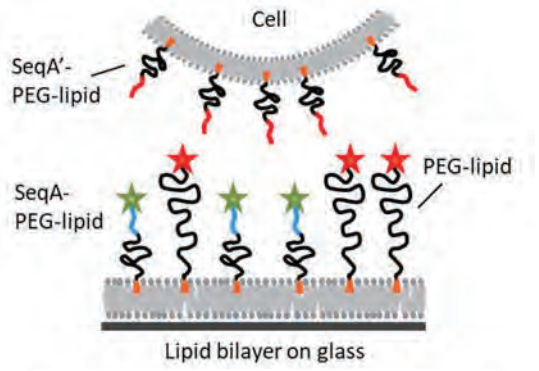


Figure 1. Schematically depicted cell attachment to SLB.

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

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

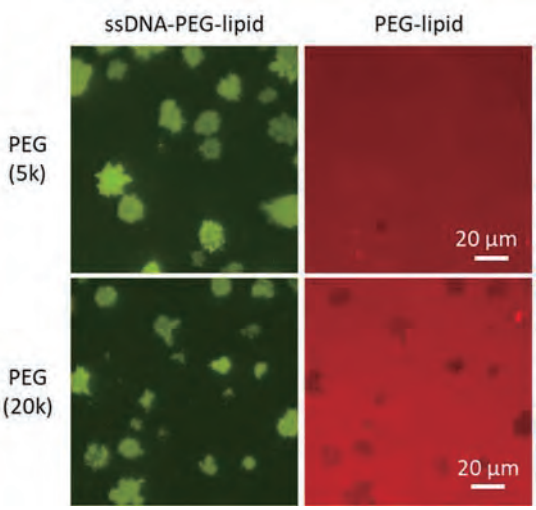


Figure 2. Fluorescence images of SLBs after attachment of CCRF-CEM cells through DNA hybridization.

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

Yusuke Arima, Jun Isobe
Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University
Tel: +81-75-751-4115, Fax: +81-75-751-4116, E-mail: arima@infront.kyoto-u.ac.jp

2C-11

中性子散乱による中間水の静的・動的構造解析

[1]東レリサーチセンター
○中田　克[1]

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

【実験】
PVP 粉末(Mw = 29,000)を 110 °C で真空乾燥した絶乾粉末に、軽水および重水を重量比で混合し試料を調製した。調製した含水率は、DSC や ^{2}H NMR から求めた中間水量の結果をもとに PVP モノマー単位(C_6H_9ON)に対して、$C_6H_9ON/2H_2O$(D_2O)、$C_6H_9ON/6H_2O$(D_2O)、および $C_6H_9ON/9H_2O$(D_2O)とした。中性子全散乱および準弾性散乱実験は、J-PARC MLF の BL21(NOVA)と BL02(DNA)をそれぞれ使用し、300 K で測定を行った。

【結果と考察】
中性子全散乱実験から得られた PVP 水溶液の静的構造因子 S(Q)では、Q = 約 1.8 $Å^{-1}$ に水の水素結合構造に由来するピークを観測することができた。このピークは純水において Q = 2.0 $Å^{-1}$ に観測されるものであり、PVP 水溶液中の不凍水や中間水は、純水に比べて水素結合ネットワークが低密度化していることがわかった。水素結合ネットワークの低密度化は、一般的には水素結合の歪が解消され、より秩序化した四面体構造を形成していることを示唆するものである。したがって、PVP 水溶液における不凍水や中間水は、純水に比べて秩序化した水素結合ネットワークを呈していると考える。
また、中性子準弾性散乱から得られた動的構造因子 S(Q,E)を解析した結果、低含水率($C_6H_9ON/2H_2O$)では、不凍水と中間水がともに PVP のピロリドン環に強く拘束され、ピロリドン環と協同的な緩和運動を呈していることが明らかになった。一方で、含水率が増加した $C_6H_9ON/9H_2O$ では、不凍水は変わらず PVP に拘束されて、PVP と協同的な運動を呈しているが、中間水は PVP からの拘束を離れて拡散運動を呈するようになることがわかった。得られた中間水の拡散係数は 5.0×10^{-10} m^2s^{-1} であり、純水(2.0×10^{-9} m^2s^{-1})と比べて約 1/4 程度遅くなっていると考えられる。
中性子全散乱と中性子準弾性散乱を用いて、PVP 水溶液の不凍水と中間水の静的・動的構造解析を行った結果、PVP に吸着した中間水は以下のような構造的、運動的特徴を有する水であることがわかった。

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

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

Static and Dynamic Structural Analysis of Intermediate Water via Neutron Scattering

Masaru Nakada[1]
[1]Toray Research Center, ing.
Tel: +81-77-533-8608, Fax: +81-77-533-8696, E-mail: masaru_nakada@trc.toray.co.jp

2C-12

刺激応答性リンクル薄膜によるハイドロゲルの接着制御

[1] 大阪大学大学院工学研究科
○加藤　雅俊[1]，麻生　隆彬[1]，宇山　浩[1]

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

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

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

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

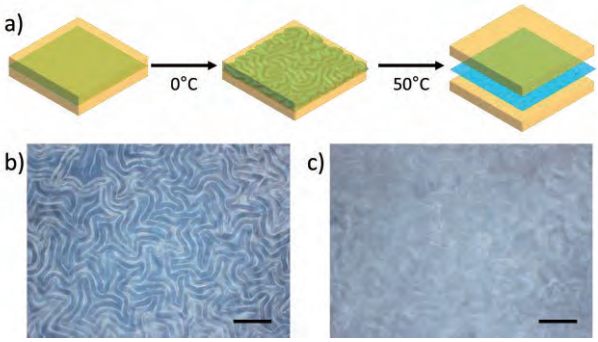


Fig. 1. (a) Adhesion control of hydrogels utilizing stimuli-responsive wrinkling film. (b, c) Microscopic observation of (b) before and (c) after heating for adhered gel-gel interface, respectively. All scale bars indicate 500 μm.

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

Hydrogel adhesion utilizing stimuli-responsive wrinkling film

Masatoshi Kato[1], Taka-Aki Asoh[1], Hiroshi Uyama[1]
[1]Department of Applied Chemistry, Osaka University
TEL: +81-6-6879-7365, FAX: +81-6-6879-7367, E-mail: m_kato@chem.eng.osaka-u.ac.jp

2C-13

皮膚の完全再生を目指したゲル状組織再生材の開発

[1] 甲南大学大学院 FIRST, [2] 甲南大学 FIRST
○小野　公佳 [1], 長濱　宏治 [2]

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

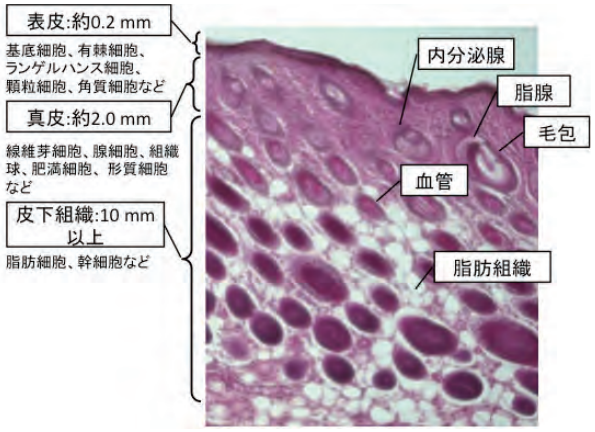


Figure 1. Tissue section of normal mouse skin stained by H&E method.

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

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

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

Kimika ONO[1] and Koji NAGAHAMA[2]
[1]Graduate school of Nanobiochemistry, Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University, Kobe 650-0047, Japan. [2]Department of Nanobiochemistry, FIRST, Konan University, Japan
Tel: 078-303-1328, Fax: 078-303-1495, e-mail: nagahama@center.konan-u.ac.jp

2C-14

アゾベンゼン基導入 UCST 型ウレイド高分子の相分離挙動の光制御

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

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

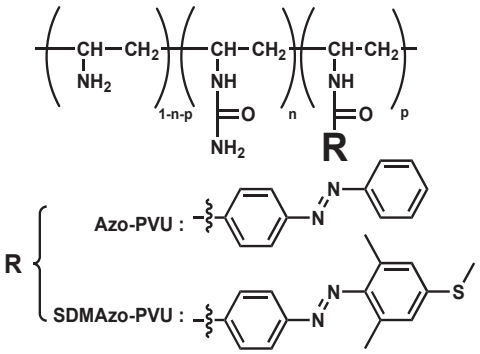


Fig. 1 Structural formulas of PVUs modified with azobenzene derivatives (Azo-PVU, SDMAzo-PVU)

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

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

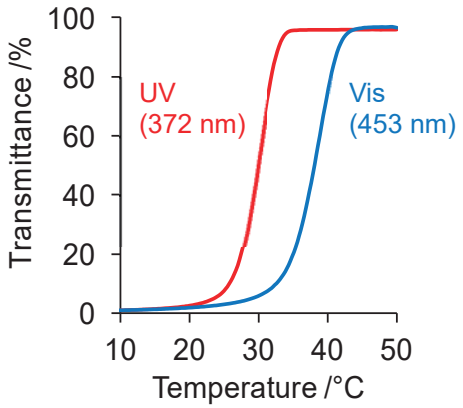


Fig. 2 Transmittance curves of UV(372 nm)- or Vis(453 nm)-irradiated Azo-PVU.

Design of photo-responsive ureido polymers containing azobenzene moieties
Naohiko Shimada[1], Nao Ikeuchi[1], Keiji Murayama[2], Hiroyuki Asanuma[2], Atsushi Maruyama[1]
[1] School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
[2] School of engineering, Nagoya University
Tel: +81-45-924-5762, Fax: +81-45-924-5762, E-mail: amaruyama@bio.titech.ac.jp

2C-15

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

[1] 大阪府立大学大学院工学研究科，[2] 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
○児島 千恵[1]，中嶌 悠介[1]，成田 侑祐里[2]，森本 直也[2]，外川 大起[2]，和久 友則[2]，田中 直毅[1]

【緒言】

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

【実験】

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

【結果と考察】

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

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

[1] Y. Kawachi, R. Kameyama, A. Handa, N. Takahashi, N. Tanaka, J. Agric. Food Chem., 61, 8868 (2013).
[2] C. Kojima, Y. Narita, T. Waku, N. Morimoto, D. Togawa, N. Takahashi, A. Handa, N. Tanaka, Chem. Lett., 46, 395 (2017).

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

Chie Kojima[1], Yusuke Nakajima[1], Yuri Narita[2], Naoya Morimoto[2], Daiki Togawa[2], Tomonori Waku[2], Naoki Tanaka[2]
[1]Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University; [2]Faculty of Molecular Chemistry and Engineering, Kyoto Institute of Technology,
Address: 1-2 Gakuen-cho Naka-ku Sakai-city Osaka 599-8570
Phone&Fax. +81-72-254-8190, E-mail. kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

2D-01

脱細胞化血管の内腔表面形状を有する PDMS レプリカの創製

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

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

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

【結果と考察】HHP 脱細胞化血管では、微細なコラーゲン繊維からなるメッシュ状の構造が観察され（Fig.1A）、生体血管と同様の長軸方向に筋状の起伏が観察された。一方、SDS 脱細胞化血管では、メッシュ形状および長軸方向への隆起は消失し、平坦な表面であった（Fig.1B）. 脱細胞化処理方法により表面形状が異なることが明らかとなった。レプリカでは、脱細胞化処理法による表面状構造の違いが写し取れていた（Fig.1C,1D）。脱細胞化血管およびレプリカ上に細胞を播種・培養し、形態および配向を評価した。NIH3T3 は、HHP 脱細胞化血管にて血管長軸に沿って配向し、高いアスペクト比の紡錘形態を示した。HHP レプリカにおいても配向度の高い進展接着が示された。一方、平坦 PDMS および SDS レプリカではランダムな向きの進展接着であった（Fig.2）。HUVEC は、HHP 脱細胞化血管および HHP レプリカで血管長軸に沿った配向度の高い細胞接着が示されたが、平坦 PDMS、SDS レプリカでは細胞の配向は示されなかった。以上より、細胞形態に表面形状が強く影響することが示され、また、血管内腔形状が特徴的機能を有することが明らかになった。さらに、生体組織の表面形状を合成材料に複製することが可能であり、血液接触デバイスの表面加工法としての可能性が期待される。

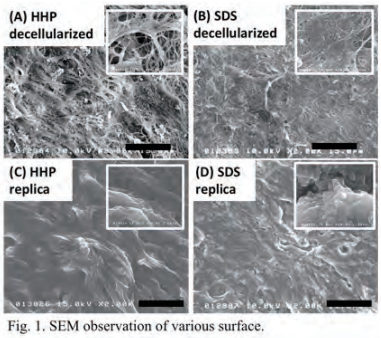


Fig. 1. SEM observation of various surface.

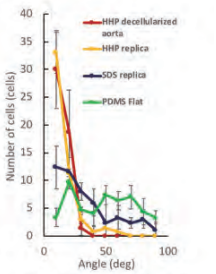


Fig. 2. Alignment of NIH3T3.

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

Tsuyoshi Kimura[1], Mayuka Kondo[1], Yoshihide Hashimoto[1], Toshiya Fujisato[2], Naoko Nakamura[3], Akio Kishida[1]
[1]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University. [2]Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 3 Department of Bioscience and Engineering, Shibaura Institute of Technology
Tel: +81-3-5280-8110, Fax: +81-3-5280-8005, E-mail: kimurat.mbme@tmd.ac.jp

2D-02

Improved endothelization of anti-platelet medical ePTFE by peptide immobilization

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

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

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

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

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

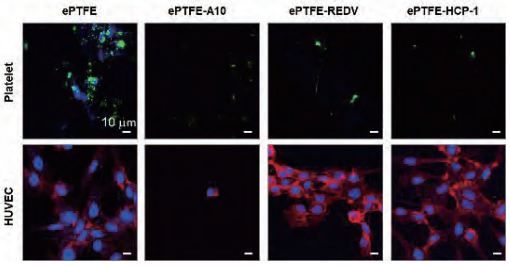


Figure 1. Platelet adhesion by porcine closed-circuit system, and HUVEC adhesion on the ePTFE and modified ePTFE surfaces.

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

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

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

Improved endothelization of anti-platelet medical ePTFE by peptide immobilization
Yihua Liu[1], Maria Chiara Munisso[1], Atsushi Mahara[1], Yusuke Kambe[1], Tetsuji Yamaoka[1]
[1]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
Tel: +81-6-6833-5012 (2637), Fax: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

2D-03

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

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

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

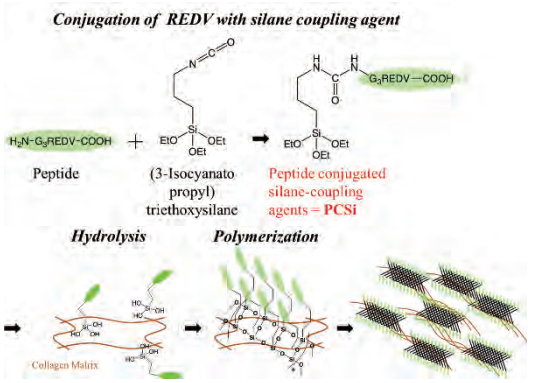


Figure 1 Synthesis of PCSi and modification of decellularized graft with PCSi.

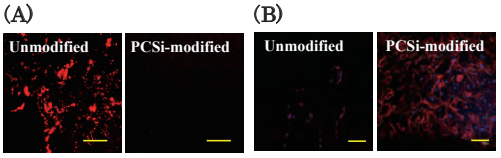


Figure 2 A) Platelet adhesion test on unmodified and PCSi-modified sruface. (Scale bar = 200 μm) **B)** Actin staining of adherent cells on unmodified and PCSi-modified graft. (Scale bar = 100 μm)

【実験方法】ペプチド（G_3REDV）と 3- (triethoxysilyl) propyl isocyanate を DMSO 中で 1 時間反応させ PCSi を得た。凍結乾燥したダチョウ頸動脈由来脱細胞血管へ 0.02－10% PCSi 溶液を滴下して、減圧乾燥により重合させた後、再水和によって PCSi 修飾グラフトを得た。放射性ヨウ素（^{125}I）標識法により PCSi 修飾グラフトの REDV 固定化密度を定量した。一方、PCSi 修飾グラフト表面にミニブタ PRP を添加後、1 時間 37℃でインキュベートし、染色により粘着量を定量した。さらに、グラフト表面に対しヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）を播種し、4 日間 37℃で培養した。その後アクチン染色を行い、接着量を定量した。また、ヒト血管内皮前駆細胞（hEPCs）を播種し、24 時間 37℃で培養した。洗浄後、接着細胞数を定量した。

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

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

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

2D-04

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

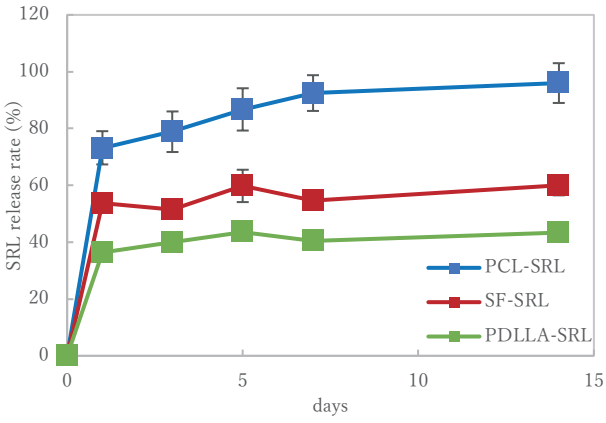
[1] 熊本大学大学院先端科学研究部，[2] 日本医療機器技研，[3] 東京農工大学大学院工学研究科
○徐 薇[1]，佐々木 誠[2]，朝倉 哲郎[3]，新留 琢郎[1]

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

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

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

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



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

Wei Xu[1], Makoto Sasaki[2], Tetsuo Asakura[3], Takuro Niidome[1]
[1]Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University
[2]Japan Medical Device Technology Co., Ltd, Kumamoto
[3]Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Engineering
Tel: +81-90-6296-0246, E-mail: 188d9404@st.kumamoto-u.ac.jp

2D-05

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

茂木　龍一[1], 西田　未来[1], 中路　正[1,2], 松村　和明[3], 阪口　壽一[4], 橋本　保[4]
[1] 富山大学大学院理工学教育部, [2] 富山大学大学院生命融合科学教育部,
[3] 北陸先端科学技術大学院大学物質科学領域, [4] 福井大学大学院工学研究科

【緒言】

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

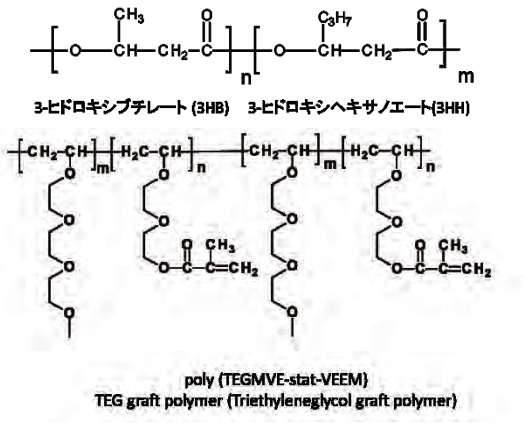


Fig.1 Sructure of PHBH and TEGMVE-stat-VEEM.

【実験】

種々組成比の poly(TEGMVE-*co*-VEEM) (TEGMVE:VEEM = 2:1, 6:1, 14:1) と PHBH を等量で混合し製膜した後、110 ℃ で一晩反応させ、VEEM 側鎖間での架橋を行った。作製したシートについて、濡れ性・力学強度・微細構造解析・生体物質応答に関する各種評価を行った。

【結果と考察】

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

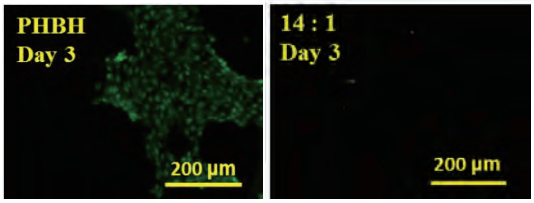


Fig. 2. Cell adhension of PHBH film and mixed film of PHBH and TEGMVE-stat-VEEM.

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

【参考文献】

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

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

Ryuichi Moteki[1], Miku Nishida[1], Tadashi Nakaji-Hirabayashi[1,2], Toshikazu Sakagichi[3], Tamotsu Hashimoto[3]
[1] Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, [2] Graduate School of Biological Science and Education, [3] Graduate School of Engineering University of Fukui
Tel : 076-455-6552　Fax : 076-455-6552　E-mail : m1771423@ems.u-toyama.ac.jp

2D-06

血液透析代替システムの実現に向けた超吸水性ナノファイバーの開発

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

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

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

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

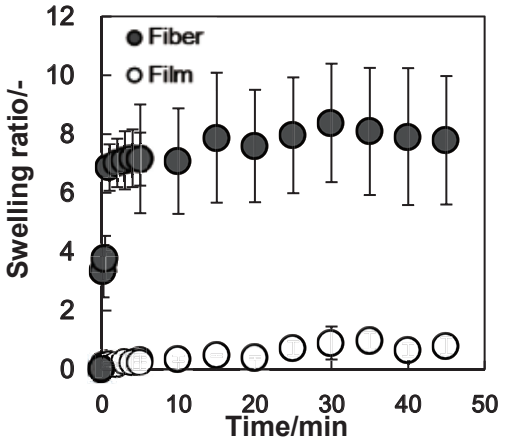


Figure 1 ： Water absorption of PSA nanofiber mesh and the film in PBS.

(1) 日本透析学会編：わが国の慢性透析療法の現況 http://docs.jsdt.or.jp/overview/pdf2016/p003.pdf. (2) K. Namekawa et al., Biomaterials Science., 2014, 2, 674-679. (3) R. Takai et al., J. Nanomater., 2016, 2016, 1-7.

Development of water absorptive nanofiber meshes for hemodialysis treatments

Mirei Tsuge[1,2] , Rio Kurimoto[2,3], Mitsuhiro Ebara[1,2,3], Akihiko Kikuchi[1]
[1] Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Science, [2] Interntl. Ctr for Mater. Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), [3]Grad. Sch. Pure & Appl. Sci., Univ. of Tsukuba
Tel: +81-29-851-3354, Fax: +81-29-851-3354, E-mail: EBARA.Mitsuhiro@nims.go.jp

2D-07

Sr イオン徐放能を付与した積層造形チタン合金の生体活性評価

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

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

【実験】
積層造形法にて作成した Ti6Al4V(EOSINT M290 SLM machine (Electro Optical Systems GmbH, Germany)を使用)の solid な造形ままの試験板を水酸化ナトリウム処理後、$CaCl_2$ と $SrCl_2$ の混合溶液に浸漬し，これを加熱した後，温水あるいは $SrCl_2$ 水溶液に浸漬した。こうして積層造形法で作成した未処理純チタン(SLM-pTi)，未処理チタン合金(SLM-Ti6Al4V)，　Ca イオン徐放能付与チタン合金(Ca-Ti6Al4V)，Sr イオンおよび Ca イオン徐放能付与チタン合金(Sr-Ti6Al4V)の 4 群で後述の実験を行なった。vitro では材料の表面に MC3T3-E1 細胞を播種し，XTT アッセイ，PCR，ALP 活性，アクチン染色，SEM での評価を行った。また vivo は，雄の日本白色家兎の両側脛骨に目的とする板状合金を埋入し，2 週，4 週での引き剥がし試験および組織学的評価を行った。

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

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

Yu SHIMIZU[1], Shunsuke FUJIBAYASHI[1], Seiji YAMAGUCHI [2], Shigeo MORI[3], Hisashi KITAGAKI[3], Makoto HAYASHI[1], Kazutaka MASAMOTO[1], Tomotoshi KAWATA[1], Kazuaki MORIZANE[1], Yaichiro OKUZU[1], Takayoshi SHIMIZU[1], Toshiyuki KAWAI[1], Bungo OTSUKI[1], Koji GOTO[1], Shuichi MATSUDA[1]
[1]Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin-Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan, [2]Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi, 487-8501, Japan, [3]Osaka Yakin Kogyo Co., Ltd., 4-4-28 Zuiko, Higashiyodogawa-ku Osaka, 533-0005, Japan
Tel: +81-75-751-3365, Fax: +81-751-8409, E-mail: ys12687@kuhp.kyoto-u.ac.jp

2D-08

水熱環境下におけるチタン基板上への層状リン酸塩の生成

名古屋大学大学院工学研究科
○中村　仁，金岡　宏明，鳴瀧　彩絵，大槻　主税

【緒言】

チタンやチタン合金の表面を、アルカリ水溶液と接触させて加熱処理することにより、チタン酸塩を形成して骨伝導性を付与する方法が知られている。すなわち、チタン系金属材料の表面に化学的な処理で、チタン化合物を形成させることで、生体に対する機能の付与が可能である。本研究では、チタン基板の表面に層状リン酸チタニウムを形成させる条件を探索した。層状リン酸チタニウムとして、α型リン酸チタニウム（α-LTP : $Ti(HPO_4)_2 \cdot H_2O$）がある。α-LTP は、Ti 原子がリン酸基によって架橋されたヘテロ層$[Ti_n(PO_4)_{2n}]^{2n-}$を有しており、イオン交換により層間にカチオンを担持できる。層間に導入するカチオンを、生体必須元素とすれば、その徐放による組織再生の促進機能も付与できる。チタン基板をリン酸（H_3PO_4）と過酸化水素（H_2O_2）を含む水溶液で水熱処理し、α-LTP の生成を調べた。

【実験】

テフロン製の水熱容器に H_3PO_4 と H_2O_2 の水溶液 10 mL を入れ、チタン基板（10×10×1 mm^3）を浸漬し、120 ºC で保持した。表 1 に、試料名と混合液の組成、反応時間をまとめた。なお、H_3PO_4 を含有しない H_2O_2 水溶液で処理したチタン基板を比較試料（Control と表記）とした。得られた基板を超純水中で超音波洗浄した後、40 ºC にて乾燥させた。試料の結晶相、表面および断面の形態について、X 線回折法（XRD）、電解放射型走査電子顕微鏡（FE-SEM）およびエネルギー分散型 X 線分光法（EDX）にて調べた。

表 1. 試料名と処理条件

試料名	水溶液の組成 / $mol \cdot L^{-3}$		反応時間 / h
	H_2O_2	H_3PO_4	
H2.5-24	2.5	4	24
H5.0-24	5.0	4	24
H8.5-24	8.5	4	24
H8.5-16	8.5	4	16
H8.5-08	8.5	4	8
Control	8.5	0	24

【結果と考察】

XRD パターンより、H2.5-24 および H5.0-24 ではチタンヒドリド（TiH_2）のピークが検出された。一方、H8.5-24 では、2θ=11.7º, 20.9º, 22.1º および 25.9º に α-LTP の 002, $20\bar{2}$, $11\bar{2}$および $20\bar{4}$（ICDD:44-0382）に帰属されるピークが検出された。H8.5-16 および H8.5-08 の XRD パターンにも α-LTP に帰属されるピークが検出された。ただし回折ピークの強度比 I_{002} / $I_{20\bar{4}}$ は、H8.5-24 < H8.5-16 < H8.5-08 の順に増加する傾向が見られ、水熱処理の反応時間が短い試料ほど、(001) が配向して α-LTP が形成することが示唆された。Control の XRD パターンからはアナターゼ型チタニア（TiO_2）のピークが検出された。α-LTP の生成は、チタン基板と H_2O_2 の反応による TiO_2 の生成（$Ti+2H_2O_2 \rightarrow TiO_2+2H_2O$）および TiO_2 と H_3PO_4 の反応（$TiO_2+2H_3PO_4 \rightarrow Ti(HPO_4)_2 \cdot H_2O+H_2O$）により進むことが推察された。

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

【謝辞】本研究は文部科学省卓越研究員制度の補助により行われたものである。

Formation of Layered Titanium Phosphate on Titanium Substrate in Hydrothermal Environment

Jin Nakamura, Hiroaki Kanaoka, Ayae Sugawara-Narutaki, Chikara Ohtsuki
Graduate School of Engineering, Nagoya University
Tel: +81-52-789-3183, Fax: +81-52-789-3182, E-mail: nakamura@chembio.nagoya-u.ac.jp

2D-09

イノシトールリン酸と銀イオンを利用した綿形状人工骨への抗菌性付与

[1] 明治大学大学院理工学研究科，[2] 明治大学研究・知財戦略機構，[3] ORTHOREBIRTH 株式会社，[4] 名古屋工業大学大学院生命・応用化学専攻
○相澤 守[1]，本田 みちよ[1]，阿部 航大[1]，横田 倫啓[2]，大坂 直也[3]，牧田 昌士[3]，西川 靖俊[3]，春日 敏宏[4]

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

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

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

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

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

Mamoru Aizawa[1], Michiyo Honda[1], Kodai Abe[1], Tomohiro Yokota[2], Naoya Osaka[3], Masashi Makita[3], Yasutoshi Nishikawa[3], and Toshihiro Kasuga[4]
[1]School of Science and Technology, Meiji University, [2]Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University, [3]ORTHOREBIRTH Co. Ltd., [4]Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Tel: +81-44-934-7237, E-mail: mamorua@meiji.ac.jp

2D-10

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

[1] 大阪大学大学院　工学研究科
○宮部　さやか[1]，計田　大希[1]，藤本　慎司[1]

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

【実験】供試材は SUS316L ステンレス鋼とし、ϕ25 mm の円盤状に切り出した。SiC 研磨紙#2000 まで湿式研磨した後、アセトン、エタノール、脱イオン水で超音波洗浄し、オートクレーブにて滅菌処理を行った。37℃、5%CO_2 に保持したインキュベーター内に設置した電気化学セル（白金を対極、Ag/AgCl を参照電極とした 3 電極セル）にて、試料を次の 3 種類の条件で保持した。(1) α -MEM（Minimum Essential Medium）溶液（タンパク質非含有）に浸漬、(2) α -MEM+10 vol%FBS（Fetal Bovine Serum；ウシ胎児血清）溶液（タンパク質含有）に浸漬、(3)試料表面上に骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を播種しα-MEM+10 vol%FBS 溶液にて培養。各条件の試料を以後、(1)をα-MEM、(2)をα-MEM+FBS、(3)をα-MEM+FBS+cells と表記する。浸漬開始から 3, 4, 5, 6, 7 日目に、パルス状電流（-100 μA/cm^2 を 0.1 s 間印加）を試料に印加する電流制御分極試験を行い、電位の経時変化を測定した。また、皮膜容量を求めるために電流制御分極試験とは別に電気化学インピーダンス測定を行った。

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

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

Sayaka Miyabe[1], Taiki Hakata[1], Shinji Fujimoto[1]
[1]Graduate School of Engineering Osaka University
Tel: +81-6-6879-7470, Fax: +81-6-6879-7471, E-mail: miyabe@mat.eng.osaka-u.ac.jp

2D-11

椎間板組織再生のための細胞低接着性コラーゲンゲルの開発

[1]近畿大学生物理工学部，[2]神戸大学大学院医学研究科，[3]神戸医療産業都市推進機構医療イノベーション推進センター
○森本康一[1]，國井沙織[1]，武岡由樹[2]，由留部 崇[2]，加藤暢宏[1]，尾前 薫[3]，黒田良祐[2]

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

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

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

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

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

Koichi Morimoto[1], Saori Kunii[1], Yoshiki Takeoka [2], Takashi Yurube[2], Nobuhiro Kato[1], Kaoru Omae[3], Ryosuke Kuroda[2]
[1]Department of Genetic Engineering, Kindai University, [2]Department of Orthopaedic Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine, [3]Translational Research Center for Medical Innovation
Tel: +81-736-77-3888, Fax: +81-736-77-4754, E-mail: morimoto@waka.kindai.ac.jp

2D-12

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

[1] 富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&テクノロジー開発センター, [2] 富士フイルム株式会社 医薬品・ヘルスケア研究所
○武田 香織[1], 岡村 愛[1], 江角 将之[1], 伏見 英生[1], 平塚 崇浩[1], 我妻 昭彦[1], 石井 善雄[2], 畠 賢一郎[1]

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

【結果と考察】 β-TCP 顆粒を 37 ℃ にて 7.5 wt% cellnest 溶液に 3 時間浸漬させ、50 ℃ にて一晩乾燥させた後に熱架橋処理を施すことで、cellnest をコートした β-TCP 製剤 (cellnest (+))を得た。製剤の凍結切片を作成し、cellnest をエオジン染色して観察したところ、cellnest が製剤内部まで浸透して β-TCP をコートしたことが確認された。β-TCP に対する cellnest コート量は、熱重量示唆熱分析 (TG-DTA)により 8.5 wt%と測定された。

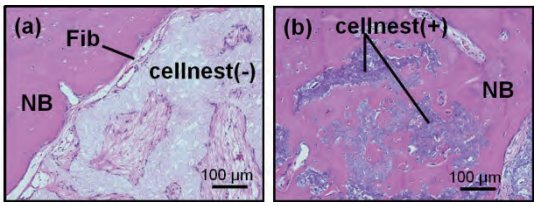


Figure 1. Representative images of hematoxylin and eosin (H&E) stained histological sections at the bone defect region. (a)cellnest (-), (b) cellnest (+). Note that the cellnest (+) is colored by H&E due to the cellnest while the cellnest (-) is uncolored. Fib: fibrous tissue. NB: new bone.

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

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

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

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

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

Kaori Takeda[1], Ai Okamura[1], Masayuki Ezumi[1], Hideo Fushimi[1], Takahiro Hiratsuka[1], Akihiko Azuma[1], Yoshio Ishii[2], Kenichiro Hata[1]
[1]Bioscience & Technology Development Center, Fujifilm Corporation, [2]Pharmaceutical & Healthcare Research Laboratories, Fujifilm Corporation
Tel: +81-465-86-3023, Fax: +81-465-86-1019, E-mail: kaori.takeda@fujifilm.com

2D-13

骨粗鬆症モデルラットによるリン酸オクタカルシウムの骨組織応答性に関する研究

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

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

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

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

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

【参考文献】

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

The bone formation of octacalcium phosphate in ovariectomized rat

Kazuyoshi Baba[1,2], Yukari Shiwaku[2,3], Takahisa Anada[2,4], Ryo Hamai[2], Yu Mori[1], Eiji Itoi[1], Osamu Suzuki[2]
[1]Department of Orthopaedic Surgery, Tohoku University School of Medicine, [2]Division of Craniofacial Function Engineering, Tohoku University Graduate School of Dentistry, [3] Liaison Center of Innovative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan, [4] Institute for Materials Chemistry and Engineerring, Fukuoka, Japan
Tel: +81-22-717-7635, E-mail: kazuyoshi714@gmail.com ; suzuki-o@m.tohoku.ac.jp

2D-14

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

[1]大阪大学，[2]名古屋工業大学
○李　誠鎬[1]，松垣　あいら[1]，春日　敏宏[2]，中野　貴由[1]

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

【実験】
46.1SiO_2·26.9*M*O·24.4Na_2O·2.6P_2O_5 (mol%, *M* = Mg, Ca, Sr)組成のガラスを溶融法(1500 ºC, 30 min)にて作製後、自動乳鉢にて粉砕した。PLLA に対する BG_M の含有量が *x* = 10, 30 vol%の複合体を加熱混錬法(190 ºC, 20 min)にて作製した。複合体中の PLLA が 14 wt%となるようクロロホルムに溶解させた紡糸溶液を用い、エレクトロスピニング法にて異方性ファイバーマット(略称：BG_Mx, *M* = Mg, Ca, Sr, *x* = 10, 30)を作製した。作製したファイバーマットの繊維径・配向度、イオン溶出挙動を評価した。異方性ファイバーマット上での、骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)による細胞増殖性、新生マウスの頭蓋冠より初代骨芽細胞を抽出し培養 3 日後の細胞配向度を評価した。

【結果と考察】
異方性ファイバーマットの繊維配向度は、BG_M10 が BG_M30 より大きい値を示した。BG_M10 は分子量が大きく多分散度が低いため、エレクトロスピニングを行う際、安定なジェットが形成され、回転コレクター上のファイバー配列を一方向に制御でき、高い繊維配向度が得られたと考えられる。一方、30 vol%含有複合体は、低い分子量・大きい多分散度を示し、ジェットが分岐され繊維配向度の低下が見られたと考えられる。骨形成を促進する Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, ケイ酸イオンの溶出量は時間と共に増加しており、イオンの徐放が期待できる。$BG_{Mg}x$ と $BG_{Sr}x$ の細胞数は Control の PLLA ファイバーマットに比べ多く、溶出した Mg^{2+}, Sr^{2+}, ケイ酸イオンにより、骨芽細胞の接着や増殖が促進されたと考えられる。BG_M10 の細胞配向度は、BG_M30 より大きい値を示した。その原因は、BG_M10 の繊維径が BG_M30 より大きく、細胞が単一繊維表面に接着することで、ファイバーマットの異方性形状により細胞配列が制御されたためと考えられる。今回作製した異方性ファイバーマットの $BG_{Mg}10$, $BG_{Sr}10$ は Control に比べ多い細胞数を示し、高い細胞配向度を示すことから、骨量・骨質の両方を同時に回復し、異方性骨組織を早期に再建できる材料として期待できる。

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

Sungho Lee[1], Aira Matsugaki[1], Toshihiro Kasuga[2], Takayoshi Nakano[1]
[1]Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University
[2]Division of Advanced Ceramics, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology
Tel: +81-6-6879-7507, Fax: +81-6-6879-7507, E-mail: leesungho@mat.eng.osaka-u.ac.jp

2D-15

アパタイト核を用いた疎水化セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与

京都大学大学院　エネルギー科学研究科
○吉岡　拓哉、藪塚　武史、高井　茂臣

【緒言】

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

【実験】

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

【結果と考察】

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

【参考文献】

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

【謝辞】

本研究の一部は、JSPS 科研費挑戦的研究（萌芽）の助成により遂行した。

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

Takuya Yoshioka, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai
Graduate School of Energy Science, Kyoto University
Tel: +81-75-753-9129, Fax: +81-75-753-9115, E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

2D-16

アパタイト被覆による石膏系骨補填材の溶解制御および骨伝導性評価

九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野
○土谷　亨，佐藤　まりの，石川　邦夫

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

【実験】超硬石膏粉末を粉液比 0.2 となるように水で練和して石膏硬化体を調製し、粉砕後に 300-400 μm にふるい分けして石膏（CS）顆粒を得た。CS 顆粒を 1 mol/L Na_2HPO_4 溶液に 20ºC, 60ºC で 7 日間浸漬した。得られた顆粒は粉末 X 線回折（XRD）により組成分析を行い、走査型電子顕微鏡（SEM）により表面形態を観察した。次に、顆粒を 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液（pH 7.5）に浸漬して 25ºC で最大 7 日間振盪し、溶液中へのカルシウムの溶解量を評価した。骨伝導性評価は兎大腿骨に φ6 mm x 3 mm の骨欠損をトレフィンバーにより作成して Ap/CSD 顆粒、比較対照群として CS 顆粒、焼結ハイドロキシアパタイト（s-HAp）顆粒をそれぞれ埋入し、埋入 4 週後に μCT および脱灰組織切片のヘマトキシリン–エオシン（HE）染色により顆粒の溶解および新生骨形成量を評価した。

【結果と考察】CS 顆粒を 1 mol/L Na_2HPO_4 溶液に浸漬した顆粒を SEM により表面形態を観察したところ、板状の結晶が顆粒表面に析出していた。得られた顆粒を XRD 解析したところ、アパタイト由来の 2θ = 25.9º、31.8ºのピークが検出されたことから、顆粒表面に析出した結晶はアパタイトであることが示唆された。また、エネルギー分散型 X 線分光法および赤外分光法により顆粒内部が CS、表面がアパタイトであることが示され、Ap/CS は CS 表面をアパタイトが覆ったサンドイッチ構造となっていることが示唆された。次に、CS 顆粒、Ap/CS 顆粒を 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液（pH 7.5）に浸漬したところ、CS 顆粒がカルシウムを急速に遊離して 1 時間で顆粒が消失したのに対し、Ap/CS 顆粒は顆粒からカルシウムを徐放し、浸漬 7 日後でも残存していた。また、60ºC で調製した Ap/CS 顆粒は、20ºC で調製した Ap/CS 顆粒よりも有意にカルシウムの遊離を抑制したことから、Ap/CS 顆粒の調製条件により顆粒の溶解速度を制御できることが示唆された。最後に、兎大腿骨に作成した骨欠損に Ap/CS 顆粒を埋入したところ、s-HAp 顆粒は埋入 4 週後に骨欠損部に残存していたのに対し、CS 顆粒、Ap/CS 顆粒は埋入 4 週後に生体内に吸収されていた。また、60ºC で調製した Ap/CS 顆粒は CS 顆粒と比較して有意に骨形成量が向上おり、表面被覆していたアパタイトにより骨形成が促進したと考えられる。

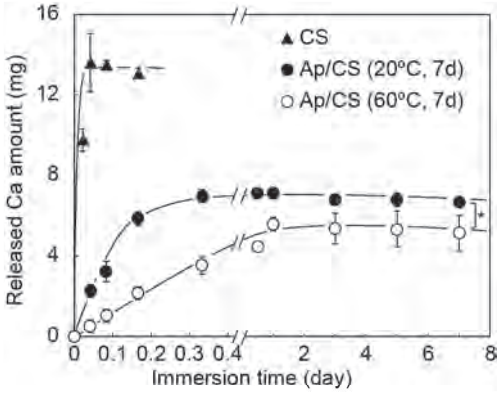


Figure 1 Ca release from granules into Tris-HCl buffer solution

Regulating dissolution of calcium sulfate granules by apatite coating

Akira Tsuchiya, Marino Sato, Kunio Ishikawa
Department of Biomaterials, Kyushu University
Tel: +81-92-642-6346, Fax: +81-92-642-6346, E-mail: tsuchiya@dent.kyushu-u.ac.jp

2D-17

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

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

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

【実験】
本研究では Nd:YAG レーザー第 4 高調波(波長 266nm、パルス幅 10ns)をβ-TCP（リン酸三カルシウム）に照射しアブレーション粒子を H_2O ガス雰囲気中で 3Y-TZP に成膜した。大部分の粒子は融点を超え液滴として付着し成膜される。その際にβ-TCP はα-TCP と変化し高温度の 3Y-TZP 表面で加水分解と結晶化を行い結晶性 HAp へと変化する。この存在比を定量的に評価するためにβ-TCP（オリンパス生体グレード）を焼結して作成したα-TCP 多結晶粉末および HAp（オリンパス生体グレード）粉末を混合、分散させ約 10%毎に重量比を変えた標準試料を作成した。この標準試料のラマン分光、X 線回折のスペクトルを測定しスペクトルの強度比率に対する混合比を予め測定し、較正曲線を求めた。この曲線を利用して実際の成膜した物質を評価することで定量的な HAp の結晶化の温度、水蒸気圧力に依存性を求めた。

【結果と考察】
0.1Torr の H_2O ガス雰囲気中で成膜した場合、3Y-TZP の基板温度が室温の場合、結晶性 HAp のスペクトルは全く観測されず、445℃でわずかに HAp 結晶の比率が上昇し、500℃以上で 60%の存在比が観測された。そのため、H_2O ガスの圧力依存性は基板温度を 500℃で固定し成膜を行った。レーザー照射時の衝撃で剥離したβ-TCP が極わずかに付着した以外、全て HAp もしくはα-TCP で他のリン酸カルシウムは確認されなかった。真空から H_2O ガス圧力の上昇とともに加水分解により HAp の存在比は急激に上昇し、圧力 0.15Torr において約 80%が HAp 結晶に変化した結果が得られた。さらに圧力を上昇すると緩やかに HAp の比率が減少している結果が得られた。これは、放出されたアブレーション粒子のうち、小型の粒子は圧力上昇により基板まで到達せず、大型の粒子のみからなる粒度分布に変化したためだと考えられる。また、付着した粒子は周囲から HAp に変化するため径が大きいほど中心までの時間を要する。実験時の成膜レートでは中心まで変化する前に次の粒子が付着し、中心まで変化するのを阻害していると推測される。今後はアブレーション粒子の粒径を小さくする、基板温度の上昇により完全 HAp 結晶化ができると考えている。

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

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

Hidehiko Yashiro[1], Nobuhiro Umebayashi[1], Masayuki Kakehata[1], Atsuo Ito[2]
[1]Electronics and Photonics Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
[2]Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Tel: +81-29-861-5142, Fax: +81-29-861-3349, E-mail: hidehiko.yashiro@aist.go.jp

2D-18

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

[1] 京都大学大学院エネルギー科学研究科, [2] 京都大学エネルギー理工学研究所
○薮塚 武史 [1], 城所 泰孝 [1], 高井 茂臣 [1], 八尾 健 [2]

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

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

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

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

【参考文献】

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

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

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

Takeshi Yabutsuka[1], Yasutaka Kidokoro[1], Shigeomi Takai[1], Takeshi Yao[2]
[1]Graduate School of Energy Science, Kyoto University
[2]Institute of Advanced Energy, Kyoto University
Tel: +81-75-753-9129 ext 16-9129, Fax: +81-75-753-9115, E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

2D-19

種々の陽イオンを置換した水酸アパタイトセラミックスの作製と細胞応答性

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

【緒言】ヒトの硬組織を構成している主な無機成分は水酸アパタイト（$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$；HAp）であり、Ca^{2+}，PO_4^{3-} および OH^-イオンに加えて、Na^+，K^+，Mg^{2+}，Sr^{2+}，Cl^-，F^- および CO_3^{2-} などの多くの微量元素を含んでいる。生物学的アパタイトは前述した微量元素が HAp へ置換することで、純粋な HAp と比較して高い生体活性を示すことが知られている。本研究では、硬組織中に含まれるミネラルの中で Ca^{2+}イオンの次に多く含まれる Na^+，K^+，Mg^{2+} の 3 種類の陽イオンに着目した。本研究では、Na^+，K^+，Mg^{2+} の 3 種類の陽イオンを 1 種類ずつ置換したアパタイトを超音波噴霧熱分解法を用いて合成し、陽イオン置換アパタイトセラミックスを作製した。陽イオン置換アパタイトセラミックス中の陽イオンの違いによる材料と細胞応答への影響を調査したので報告する。

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

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

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

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

[1] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phosphorus Res. Bull.*, **20**, 61-78 (2006).
[2] T. Yokota, M. Honda and M. Aizawa, *Phosphorus Res. Bull.*, **33**, 35-40 (2017).

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

Rina Ito[1], Tomohiro Yokota[2], Mamoru Aizawa[1]
[1] Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University, Kawasaki, Japan
[2] Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property Meiji University
Tel: +81-44-934-7237, Fax: +81-44-934-7906, E-mail: mamorua@meiji.ac.jp

2D-20

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

1国際先端科学技術研究機構，熊本大学,2-39-1黒髪中央区，熊本 860-8555,日本
○鄭　玉峰[1]，阮　立群[1]，高島　和希[1]

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

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

【結果と考察】焼結の後で 、HA は Zn の境界で均一に分布された。腐食試験は、Zn と HA の双相組織のある特徴によって、Zn-HA 複合材料の生分解速度が調整可能であることを示した。さらに、Zn-HA 複合材料は、模擬人体の体液の中で、材料表面に $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ の形成を起こした。Zn-HA 複合材料は、純 Zn に比べて、造骨性の MC3T3-E1細胞の生存能力がかなり高められたことを示した。純 Zn と複合材料は、低い血栓症リスクと溶血率を表していた。効果的な抗菌性のプロパティはよく観察された。純 Zn と複合材料の Zn-5HA のボリューム損失は、8週間の埋め込みの後に、それぞれ1.7%と3.2%を減少した。組織学の分析では、第4週に純 Zn と複合材料 Zn-5HA の周りに新しく形成された骨を見つけて、まだ、時間の増加に従って、骨塊が増大した。延長された埋め込み時間の場合、複合材料 Zn-5HA は、新しい骨の形成を刺激することに対して、純 Zn より効果的であった。纏めますと、調整可能な生分解速度および改善する生体適合性を持つ Zn 基 MMC は、骨の修復に応用できる材料だと考えられる。

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

Yufeng Zheng[1], Liqun Ruan[1] and Kazuki Takashima[1]
[1] International Research Organization for Advanced Science and Technology,Kumamoto University,2-39-1 Kurokami, Chuo-Ku, Kumamoto 860-8555, Japan
Tel: +81-096-342-3405, Fax: +81-096-342-3405, E-mail: yfzheng@kumamoto-u.ac.jp

2D-21

ナノ表面構造による特異な「直交性骨基質配向化」機構

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

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

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

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

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

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

Aira Matsugaki[1], Yohei Nakanishi[1], Kosuke Kawahara[2], Takafumi Ninomiya[2], Hiroshi Sawada[2], Takayoshi Nakano[1]
[1]Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University [2] Canon Machinery Inc.
Tel: +81-6-6879-7505, Fax: +81-6-6879-7505, E-mail: nakano@mat.eng.osaka-u.ac.jp

2D-22

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

京都大学大学院エネルギー科学研究科
○渡邉　慎，薮塚　武史，高井　茂臣

【緒言】

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

【実験】

1.0M NaOH水溶液を電解液として定電圧10 Vを10分間印加し、Mg合金(AZ-31)に陽極酸化を施した。ヒトの血漿の3倍の濃度となるよう、7.5 mM Ca^{2+}および3.0 mM HPO_4^{2-}の濃度をもつ水溶液を調製した。この水溶液を以後CaP溶液と称する。続いて、陽極酸化後および未処理のAZ-31を36.5 ℃ pH 5.0および6.0のCaP溶液に浸漬し、36.5 ℃の恒温槽中で1日間静置した。取り出した試料は純水ですすいだ後、室温で風乾した。作成した試料表面および断面をTF-XRD, FE-SEM, EDXで測定した。また試料の耐食性はPBS中でのインピーダンス測定で評価した。

【結果と考察】

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

【参考文献】

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

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

Shin Watanabe, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai
Graduate School of Energy Science, Kyoto University
Tel: +81-75-753-9129, Fax: +81-75-753-9115, E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

2D-23

ミネラル複合化リポナノカプセルを用いた硬組織修復用材料の作製

慶應義塾大学大学院理工学研究科
○多部田　郁絵，福井　有香，藤本　啓二

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

【実験】カチオン性多糖であるキトサン(CHI)に五酸化二リンを反応させて、リン酸化度の異なるリン酸化キトサン(P_{CHI})を作製した。次に、カプセルの基材として、粒径が約 100 nm のカチオン性のリポソーム($Lipo^+$)を作製した。P_{CHI} がアニオン性を示す pH 7.0 において $Lipo^+$表面に P_{CHI} の吸着を行い($Lipo^+$-P_{CHI})、動的光散乱法による水中粒径測定、表面電位測定を行った。得られた Lipo-P_{CHI} の硬組織付着性を検討するために、Hydroxyapatite (HAp)粉体に $Lipo^+$-P_{CHI} を加えてインキュベート(37ºC、24 時間)を行った。次に、HAp 粉体をリン酸緩衝液(PB)でリンスを行い、Nile Red によって Lipo(+)-P_{CHI} を染色して蛍光顕微鏡観察を行った。また、$Lipo^+$-P_{CHI} 表面に CaP 層を形成させるために、$Lipo^+$-P_{CHI} 分散液を $CaCl_2$ 水溶液と PB に対して 60 min 毎に交互に透析を繰り返し、pH、温度、イオン濃度などを調節することで CaP 結晶の構造制御を試みた。得られたミネラル複合化リポナノカプセル($Lipo^+$-P_{CHI}-CaP)について、透過型電子顕微鏡(TEM)による形状観察、X 線回折(XRD)による結晶構造の解析を行い、Ca^{2+}量から CaP の生成量を求めた。次に、硬組織修復用材料への応用を見据えて、$Lipo^+$-P_{CHI}-CaP を集積化し、CaP 飽和水溶液中でインキュベート(37ºC)することで CaP の成長とカプセルの組織化を試みた。

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

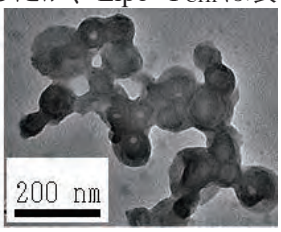


Fig. 1　TEM image of $Lipo^+$-$P_{CHI}^{1.2}$-CaP produced by the alternative dialysis

Mineralization of Hybrid Liponanocapsules for Hard Tissue Repair and Regeneration
Ikue Tabeta, Yuuka Fukui, Keiji Fujimoto
Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: +81-45-566-1580, Fax: +81-45-566-1551, E-mail: fujimoto@applc.keio.jp

2E-01

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

Yazhou Chen[1,2], Naoki Kawazoe[1], and Guoping Chen[1,2]

[1] Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba,Ibaraki 305-0044, Japan
[2] Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan
Tel: 029-860-4496, *Correspondence: Guoping.CHEN@nims.go.jp

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

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

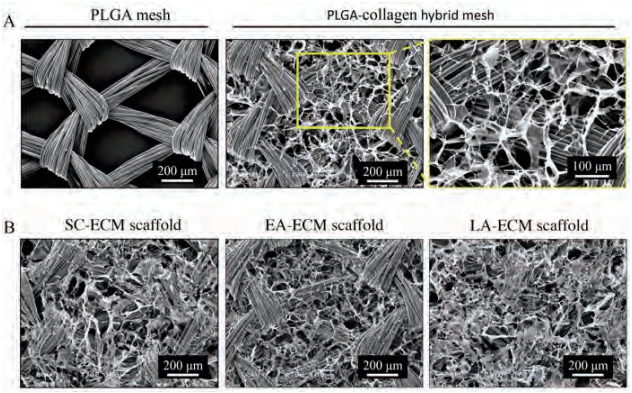


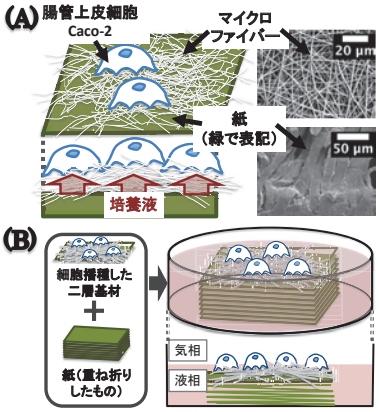
Fig. 1. (A) SEM images of PLGA mesh and PLGA-collagen hybrid mesh. (B) SEM images of SC-ECM scaffold, EA-ECM scaffold and LA-ECM scaffold.

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

2E-02

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

早稲田大学大学院　先進理工学研究科
○長澤真理，今任景一，武田直也



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

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

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

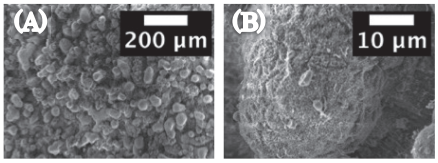


Figure 2. SEM images of the engineered gut model by air-liquid interface culture. (A) Villi-like 3D structure. (B) Microvilli at the apical surface.

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

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

Mari NAGASAWA, Keiichi Imato, Naoya Takeda
Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University (TWIns)
Tel: +81-03-5369-7323, Fax: +81-03-5369-7323, E-mail: ntakeda@waseda.jp

2E-03

弾性率と生分解性を独立して制御可能なシルクゲルの開発

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

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

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

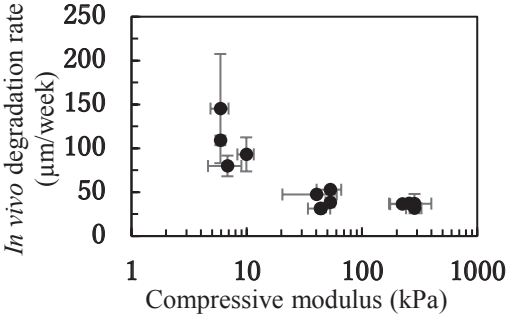


Fig.1 Relationship between the compressive modulus and *in vivo* biodegradation rate of SF gels.

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

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

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

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

Yuji MIZOGUCHI[1,2]，Yusuke KAMBE[1]，Yoshiaki HIRANO[3] and Tetsuji YAMAOKA[1]
[1]Department of Biomedical Engineering，National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
[2]Graduate School of Science and Engineering，Kansai University
[3]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering，Kansai University
[1]Tel：+81-6-6833-5012，FAX：+81-6-6835-5476，E-mail：ykambe@ncvc.go.jp

2E-04

羊毛ケラチン薄膜の作製

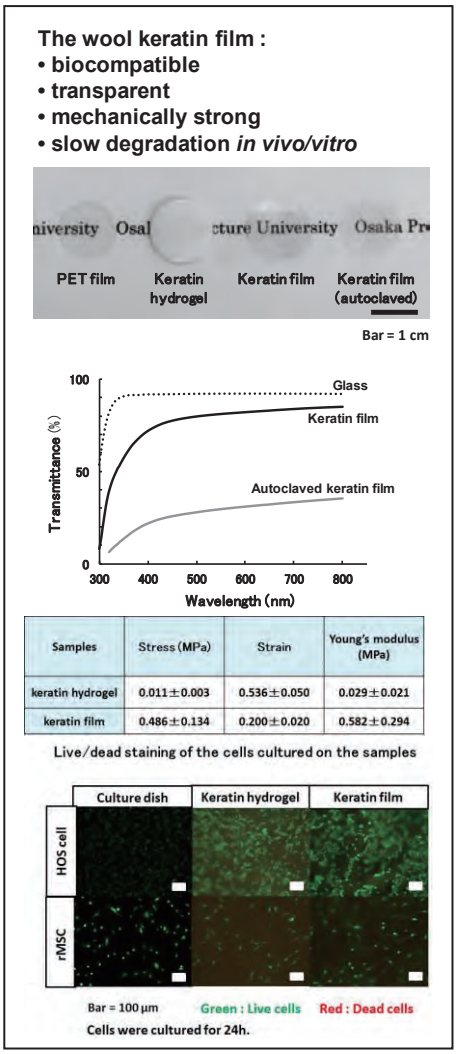
大阪府立大学　大学院理学系研究科生物科学専攻　細胞組織工学研究室，○原 正之，森 英樹

【緒言】

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

【実験】

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



Samples	Stress (MPa)	Strain	Young's modulus (MPa)
keratin hydrogel	0.011±0.003	0.536±0.050	0.029±0.021
keratin film	0.486±0.134	0.200±0.020	0.582±0.294

【結果と考察】

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

【参考文献】

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

Transparent biocompatible wool keratin film

Hideki Mori, Masayuki Hara
Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570, Japan
Tel: +81-72-254-9842, Fax: +81-72-254-9842, E-mail: hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

2E-05

凍結乾燥生体由来材料の復元及び機能化への真空加圧含浸技術の応用

[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ニクス研究拠点，物質・材料研究機構
○根岸　淳[1]，橋本　良秀[2]，岸田　晶夫[2]，舩本　誠一[2, 3]

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

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

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

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

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

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

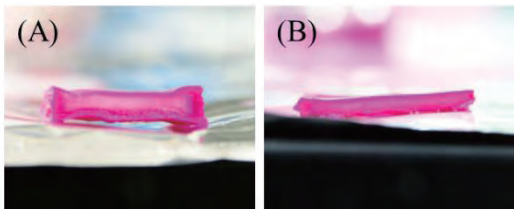


Figure 1. (A) Rhodamine-PEG immersed aorta and (B) Rhodamine-PEG VPI aorta.

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

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

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

Jun NEGISHI[1], Yoshihide HASHIMOTO[2, 3], Akio KISHIDA[2], Seiichi FUNAMOTO[2, 3]
[1]Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University
[2]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
[3]International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science
Tel: +81-268-21-5335, Fax: +81-268-21-5331, E-mail: jnegishi@shinshu-u.ac.jp

2E-06

シルクフィブロイン基材上での iPS 細胞の培養挙動

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

【緒言】

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

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

【実験】

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

【結果と考察】

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

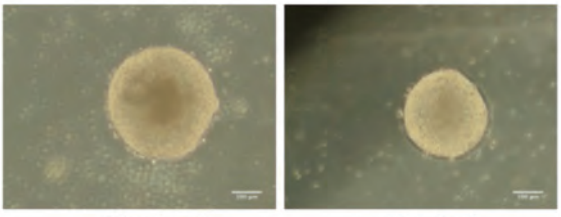


図 1 シルク基材上で培養した iPS 細胞コロニー

Behavior of iPS cells cultured on silk fibroin substrate

Minori Shirakawa[1], Mizuki Sasaki[1], Tetsuji Yamaoka[2], Yasushi Tamada[1]
1 Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University
2 National Cerebral and Cardiovascular Center
Tel: 0268-21-5359,　Fax: 0268-21-5331,　E-mail: ytamada@shinshu-u.ac.jp

2E-07

表面改変マクロファージによる生きたがん細胞の捕捉と消去

[1] 関西大学大学院理工学研究科, [2] 関西大学化学生命工学部, [3] 関西大学 ORDIST
○杉本　駿介[1], 山内　柊平[2], 大高　晋之[3], 岩﨑　泰彦[2,3]

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

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

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

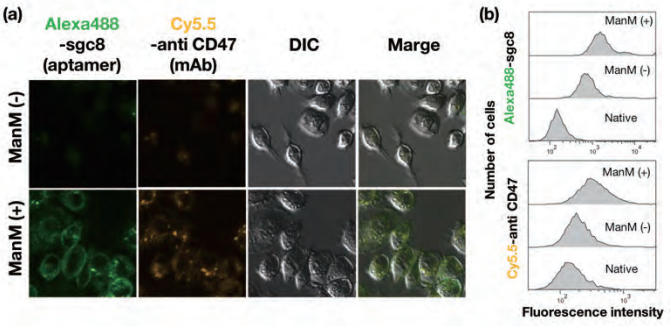


Figure 1　(a)Differential interference contrast (DIC) and laser scanning confocal (LSC) micrographs of RAW264.7 cells. The cells were treated after contact with Alexa488-aptamers and Cy5.5-anti CD47 antibodys. (b)Fluorescence intensity was determined by flowcytometry.

【謝辞】本研究は科研費(No.17K20119)により実施された。
【文献】1) S. Sugimoto et al., *Chem. Comm.* **2015**;51:17428. 2) P. S. Petrova et al., *Clin. Cancer Res.* **2017**;23:1068. 3) Y. Iwasaki et al., *Macromol. Biosci.* **2011**;11:1478.

Elimination of live cancer cells by surface-engineered macrophages

Shunsuke Sugimoto[1], Shuhei Yamauchi[2], Akihisa Otaka[3], Yasuhoko Iwasaki[2,3]
[1]Graduate School of Science and Engineering, Kansai University, [2]Department of Chemistry and Materials Engineering, [3]ORDIST, Kansai University
Tel: +81-(0)6-6368-0090, Fax: +81-(0)6-63680090, E-mail: yasu.bmt@kansai-u.ac.jp

2E-08

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

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

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

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

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

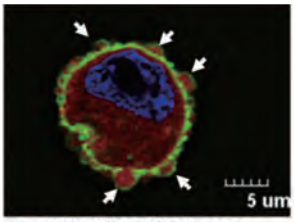


Fig.1 PMEA上におけるHT-1080細胞のBlebbing様現象（培養1時間）
赤色がvinculin、緑色がF-actin、青色が核。矢印はBlebbing様現象を示す。

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

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

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

2E-09

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

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

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

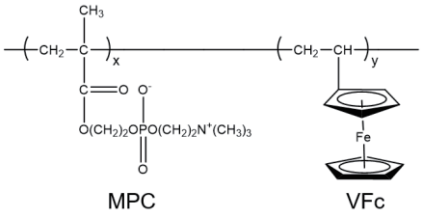


Figure 1 Chemical structure of pMFc.

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

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

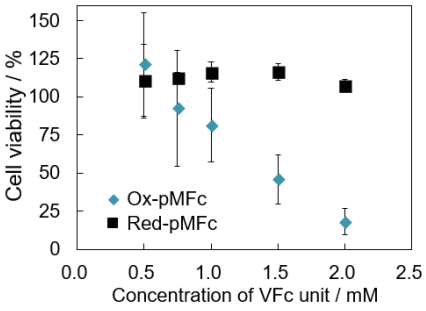


Figure 2 Cell viability of MDA-MB-231 cells after the addition of pMFc.

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

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

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

Masahiro Kaenko[1], Masahito Ishikawa[2,3], Kazuhiko Ishihara[1], Shuji Nakanishi[3]
[1]Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, [2]Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, [3]Nagoya University, Research Center for Solar Energy Chemistry, Osaka University
Tel: +81-3-5843-7128, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: kaenko@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

2E-10

骨転移がん治療を目指した骨指向性リン脂質ポリマー

[1]関西大学 ORDIST，[2]関西大学化学生命工学部，[3]松本歯大学歯学部
○大高　晋之[1]，山口　知己[2]，平賀　徹[3]，岩﨑　泰彦[1,2]

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

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

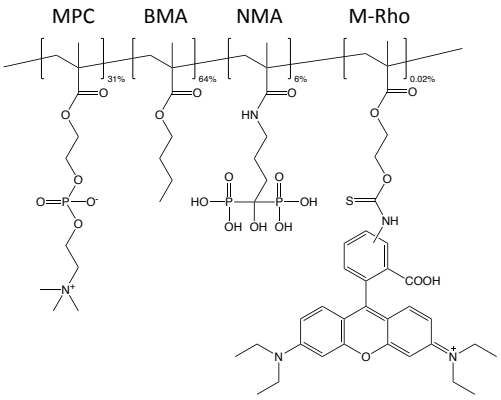


Figure 1: Structure of bone targeting polymer

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

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

Bone-targeting phospholipid polymer as chemotherapy for bone metastasis

Akihisa Otaka[1], Tomoki Yamaguchi[2], Toru Hiraga[3], Yasuhiko Iwasaki[1,2]
[1]ORDIST, Kansai University [2]Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University. [3]Department of Histology and Cell Biology, Matsumoto Dental University.
Tel: +81-6-6368-1121 (ext. 5742), Fax: +81-6-6368-0090, E-mail: yasu.bmt@kansai-u.ac.jp

2E-11

ディッシュ型金属製細胞培養容器を用いた MCF-7 細胞の培養

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

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

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

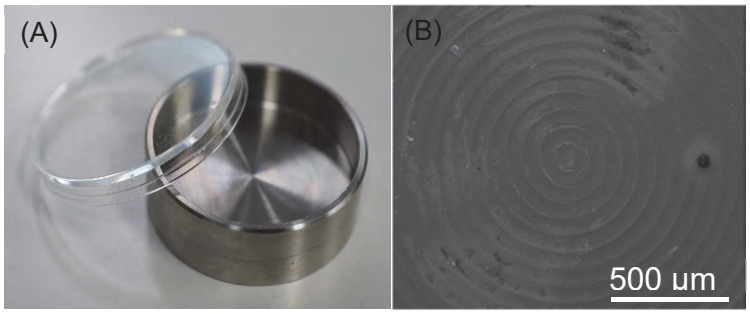


Figure 1 (A) Metallic dish (i.d.=35mm, height=14 mm), (B) SEM image of surface

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

Culture of MCF-7 human breast cancer with metallic dish

Haruka TAKESHITA[1], Yuta IDA[2], Yuta KURASHINA[3], Shogo MIYATA[1], Kenjiro TAKEMURA[1], Jun KOMOTORI[1]
[1]Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University [2] Graduate School of Science and Technology, Keio University [3]Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology
Tel: +81-45-566-1502, Fax: +81-45-566-1502, E-mail:o-ji.lopear_abyss@keio.jp

2E-12

水酸化ナトリウム水溶液処理が多孔質チタニア微小球の構造と物性に及ぼす影響

[1] 東北大学大学院工学研究科，[2] 東北大学大学院医工学研究科
○半田　祥真[1]，　川下　将一[2]

【緒言】肝臓がん治療低侵襲機能温存療法の一つに、肝動脈化学塞栓療法がある。同法では、抗がん剤を表面に吸着させた微小球によって腫瘍近位の毛細血管を塞栓し、がん細胞への栄養補給を断つと同時に、塞栓先の狭い範囲にのみ抗がん剤を徐放して治療を行う。これまでに我々は、シリカナノ粒子（SNP）を含むチタニア（TiO_2）微小球を 3 M、20℃の水酸化ナトリウム水溶液（NaOH aq.）で 24 時間処理すれば、多孔質 TiO_2 微小球が得られ、同微小球が毛細血管の直径と等しい 20 μm 程度の粒径を持ち、優れたドキソルビシン（DOX）吸着・徐放能を持つことを明らかにした。しかし、NaOH aq. 処理後も SNP の一部が微小球内に残存し、それが細胞毒性を引き起こす懸念があった。そこで本研究では、SNP の溶解に用いる NaOH aq. の濃度と温度を変化させ、NaOH aq. 処理が多孔質 TiO_2 微小球の構造と物性に及ぼす影響を調べた。

【実験】油相として、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノステアレート、1-ブタノール、ケロシンの順にビーカーに加え撹拌した。また水相として、メタノール、チタンテトラプロポキシド、ジエタノールアミンの順にビーカーに加え撹拌した。さらに粒径 50 nm の SNP 混濁液を水相に加え、全体を油相に少しずつ加え撹拌した。上澄み液を取り除いて試料表面を洗浄し、乾燥させた後に 150℃で 13 時間および 600℃で 8 時間加熱処理することで SNP 含有 TiO_2 微小球を得た。SNP 含有微小球を 1 M、4 M あるいは 7 M の NaOH aq. に浸漬し、50℃あるいは 80℃で 24 時間振とうさせた。その後、上澄み溶液を取り除いて試料表面を洗浄し、乾燥させることで多孔質 TiO_2 微小球を得た。走査型電子顕微鏡（SEM）およびフーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）を用いて、得られたサンプルの構造解析を行った。さらに、DOX 水溶液に微小球を浸漬し、36.5℃で 5 時間回転浸漬させることで DOX 吸着試験を行い、その後リン酸緩衝生理食塩水に DOX 吸着微小球を浸漬し、36.5℃で 1 週間回転浸漬させることで DOX 徐放試験を行った。

【結果と考察】SEM 観察によれば、いずれの NaOH aq. 処理条件においても微小球は崩壊せず、処理前と同じ粒径 20 μm 程度の球形を保っていた。また、その表面は、出発溶液に添加した SNP の粒径と同じ約 50 nm の細孔構造を有していた。これより、NaOH aq. 処理により SNP 含有 TiO_2 微小球から SNP が溶出し、微小球が多孔質化したと考えられる。また、FT-IR 測定によれば、50℃の 1 M NaOH aq. 処理後にも Si-O に帰属される吸収バンドがわずかに見られたが、これは TiO_2 微小球のマトリックス中に閉じ込められた SNP によるものと考えられ、そのような SNP が生体内で微小球から溶出する可能性は極めて低いと推察される。また、DOX 吸着・徐放試験によると、50℃の 1 M NaOH aq. 処理により得られた多孔質 TiO_2 微小球は、1 mg あたり最大 9.9 μg の DOX を吸着し、7.8 μg の DOX を 1 週間以内に徐放した（徐放率 約 79%）。以上より、本研究により得られた多孔質 TiO_2 微小球は、肝動脈化学塞栓療法に有用であると期待される。

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

Shoma Handa[1], Masakazu Kawashita[2]
[1]Graduate School of Engineering, Tohoku University, [2]Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University
Tel: 022-795-4735, Fax: 022-795-4735, E-mail: shoma.handa.q1@dc.tohoku.ac.jp

2E-13

白血病細胞結合ペプチドの高密度固定化表面による高効率細胞捕捉

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

【緒言】

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

【実験】

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

【結果と考察】

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

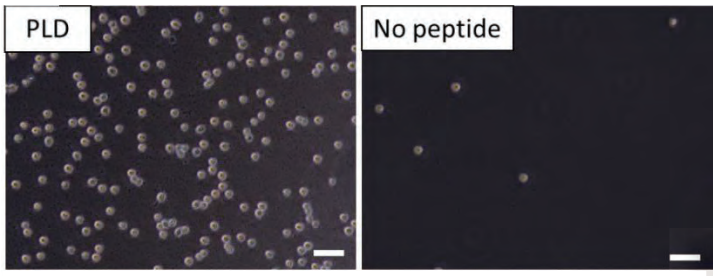


Fig. 1. CCRF-CEM cells adhered on PLD peptide-immobilized (left) and no peptide-immobilized (right) PSMA-coated surface. Scale bars: 50 μm.

【参考文献】

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

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

Akifumi Yoshihara[1], Tomoyuki Azuma[1], Yoshiyuki Yamada[2], Madoka Takai[1]
[1]Graduate School of Engineering, The University of Tokyo
[2]Gunma Children's Medical Center
Tel: +81-03-5841-2959, Fax: +81-03-5841-0621, E-mail: yoshihara@bis.t.u-tokyo.ac.jp

2E-14

アレルゲン特異的な免疫治療を目指したビタミン–ペプチドコンジュゲートの創製

[1] 九州大学大学院工学研究院，[1,2] 九州大学未来科学創造センター，[3] 九州大学分子システム科学センター，[4] 九州大学先端医療イノベーションセンター
○杠　和樹[1]，吉田　綾香[1]，岸村　顕広[1,3]，森　健[1,2]，片山　佳樹[1,2,3,4]

【緒言】

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

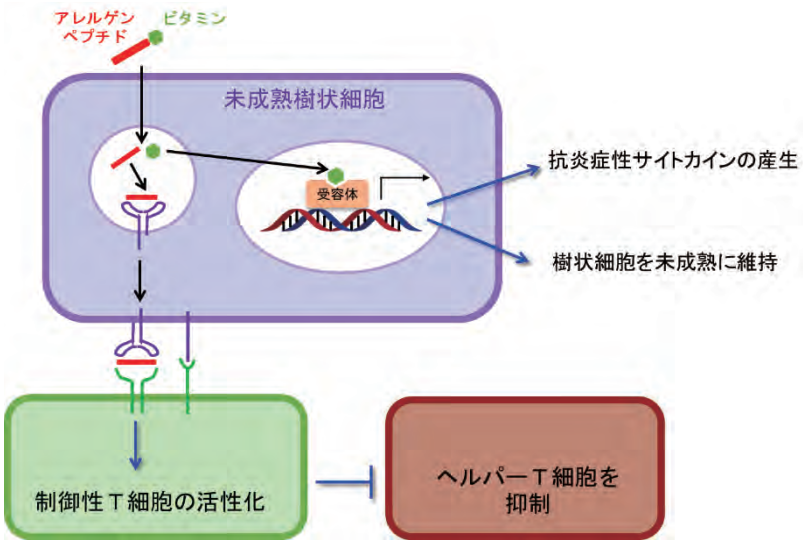


Fig.1 ビタミン-ペプチドコンジュゲートの作用機序

【実験】

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

【結果と考察】

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

Development of vitamin-peptide conjugate for allergen-specific immunotherapy

Kazuki Yuzuriha[1], Ayaka Yoshida[1], Akihiro Kishimura [1,3], Takeshi Mori[1,2], Yoshiki Katayama[1,2,3,4]
[1]Depertment of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University, [2]The Center for Future Chemistry, Kyushu University, [3]International Research Center for Molecular System, Kyushu University, [4]Center for Advanced Medical Innovation, Kyushu University, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan, Tel: +81-92-802-2850, Fax: +81-92-802-2850 E-mail: k.yuzuriha@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

2E-15

抗原修飾ヒアルロン酸の細胞取り込み及び抗原提示能の評価

[1] 北九大院工
○森高　敦[1]，櫻井　和朗[1]，望月　慎一[1]

【緒言】
近年、三大がん治療に次ぐ、新規がん治療として、がん免疫療法が注目されている。がん免疫療法とは、人々の身体に本来備わっている免疫力を活かした治療法であり、副作用が少なく、従来の治療法と組み合わせて行うこともできることから大いに期待されている。がん免疫療法において、がん細胞を攻撃する細胞は、細胞障害性T細胞（CTL）として知られていて、このCTLはがん細胞表面上にある抗原ペプチドを目印として攻撃を行う。しかし、抗原ペプチドはその細胞が体にとって異物かどうか知らせるために発現するもので、元々自己の細胞が変異したがん細胞では、抗原性が弱いことで知られている。そこで、外来から非自己の抗原タンパク質を送達することができれば、CTLががん細胞を認識しやすくなり、免疫効果の向上が期待できる。
本研究は、がん細胞に外来の抗原を送達するために、がん細胞特異的キャリアを用いた抗原送達システムの開発を目指している。がん細胞表面上には、CD44というヒアルロン酸を認識する受容体が過剰に発現しているため、我々はキャリアとして、ヒアルロン酸を選択した。よって、ヒアルロン酸に、抗原タンパク質を化学修飾させ、細胞取り込みを誘導し、複合体の抗原提示能を評価することを目的とする。

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

【結果と考察】
UVのクロマトグラムからOVAとHAの反応の進行を評価した（Figure1）。HAにUVの吸収はなく、OVAには280 nmの吸収があることから、OVAの溶出時間の変化から反応を判断できる。18分に現れているピークがOVAのみを流した時のピークで、HAと反応させるとそのピークが14分頃に移動していることがわかった。これより、OVAにHAが結合することで分子量が増大し、溶出時間が早まったと考えられる。
また、HAとOVAの反応溶液には未反応のOVAが検出されないことから、ほぼ全てのOVAがHAと結合していること考えられる。屈折率と光散乱の結果から算出したHA/OVAの混合物とHA単体、OVA単体の分子量は順に1.4×10^{6}、7.5×10^{5}、5.0×10^{4}であった。分子量とHAとOVAの仕込み比よりHA 1分子当たり12分子のOVAが、結合していると考えられる。

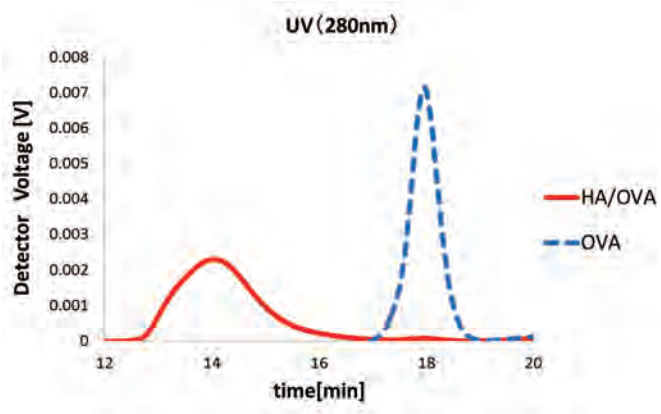


Figure1. Results of GPC(UV)

Evaluation of cellular uptake and antigen presenting ability of antigen-modified hyaluronic acid
Atsushi Moritaka, Kazuo Sakurai, Shinichi Mochizuki (Department of Chemistry and Biochemistry, the University of Kitakyushu, 1-1 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu, Fukuoka 808-0135, Japan)
Tel: +81-93-695-3298, Fax: +81-93-695-3390, E-mail: y7mab013@eng.kitakyu-u.ac.jp

2E-16

エクソソームインプリント材料によるがん細胞由来インタクトエクソソーム認識

[1]神戸大学大学院工学研究科，[2]安田女子大学薬学部
○竹内　俊文[1]，森　貴翔[1]，高野　恵里[1]，砂山　博文[1,2]，北山　雄己哉[1]

【緒言】エクソソームは、さまざまな細胞内から、エンドソームに由来して細胞外に放出される脂質二重膜を有する細胞外小胞である。最近、エクソソーム内部に放出された細胞に由来するmiRNA が含まれることが発見され [1]、エクソソームが細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。それ以降、エクソソーム関連研究は爆発的に進展しており、直近では、エクソソーム表面のインテグリンファミリーが、がん転移の臓器指向性に資することが報告され [2]、ますますエクソソーム関連研究の重要性が高まっている。

がんの臓器指向性やがん転移、がんの悪性化に関わるエクソソームの解析は、がんを診断する極めて重要なツールになることが予想される。しかしながら、現状のエクソソーム分析は、超遠心やアフィニティー分離などを併用して行われるため、簡便で迅速とは言いがたい。煩雑な前処理をすることなしに、がん細胞から放出されるエクソソームと正常細胞由来エクソソームを識別することができれば、生検に代わるがん診断のための新たなリキッドバイオプシー技術となることが期待される。本研究では、標的エクソソームを迅速･簡便に識別できるエクソソームセンシングシステムを開発し、がん診断のためのリキッドバイオプシーに適用可能かどうか検討した。

【実験】エクソソームセンシング材料は、分子インプリンティング技術 [3]とポストインプリンティング蛍光修飾技術[4-6]を用いて、エクソソーム表層の膜タンパク質を認識する抗体を分子認識素子に用いて調製した。

【結果と考察】得られたエクソソームセンシング材料に対するエクソソームの吸着等温線を作成し、見かけの結合定数を算出したところ、$10^{16}\ M^{-1}$ オーダーと見積もられ、検出試薬などを添加することなしに、高感度でインタクトエクソソームの蛍光センシングが可能であることがわかった。また、希釈血清中でも緩衝液中と同様の応答を示した。さらに、複数の膜タンパク質の検出パターンから、健常人由来エクソソームとがん細胞由来エクソソームの識別が可能であったことから、本法は、生検に代わる簡便で迅速なリキッドバイオプシー手法として期待される。

【参考論文】

[1] Valadi, H. et al., *Nat. Cell Biol.* 2007, 9, 654.
[2] Hoshino, A. et al., *Nature* 2015, 527, 329-335.
[3] Takeuchi, T. et al., *Chromatography* 2014, 35, 139-145 (Open access).
[4] Horikawa, R. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 13023.
[5] Takeuchi, T. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 12765.
[6] Takeuchi, T. et al. *Chem. Commun.*, 54, 6243-6251 (Feature article).

Exosome-imprinted thin films for recognizing intact exosomes derived from cancer cells

Kisho MORI[1], Eri TAKENO[1], Hirobumi SUNAYAMA[1,2], Yukiya KITAYAMA[1], Toshifumi TAKEUCHI[1]
[1] Graduate School of Engineering, Kobe University
[2] Faculty of Pharmacy, Yasuda Women's University
Tel: +81-78-803-6158, Fax: +81-78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

2E-17

炎症環境の改善を目指した アポトーシス細胞膜模倣型ポリマーと抗炎症評価

[1] 東京理科大学大学院 基礎工学研究科, [2] 物質・材料研究機構 (NIMS) 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA) , [3] 筑波大学大学院 数理物質科学研究科
○矢野宥人 [1,2], 中川泰宏 [2,3], 菊池明彦 [1], 荏原充宏 [1,2,3]

【緒言】近年、アポトーシス細胞によるマクロファージの抗炎症性サイトカイン産生誘導や活性酸素の生産抑制など、能動的な抗炎症機能が報告されている。この抗炎症機能の主なメカニズムとしては、アポトーシス細胞が提示するホスファチジルセリン (PtdSer)に起因することが明らかとなっている。しかしながらアポトーシス細胞を患者に投与する場合、安全性の担保や運用コスト、汎用性等の問題点が挙げられる。そこで、細胞を用いない治療法の確立のため、アポトーシス細胞膜を模倣した抗炎症作用を有する高分子材料の開発を試みることを本研究の目的とした (Fig. 1)。本発表では、PtdSer の抗炎症活性部位であるホスホリルセリン (PS)基を有するメタクリル系モノマー、ポリマー (poly(MPS))の合成及びミクログリアを用いた抗炎症活性評価を行った。

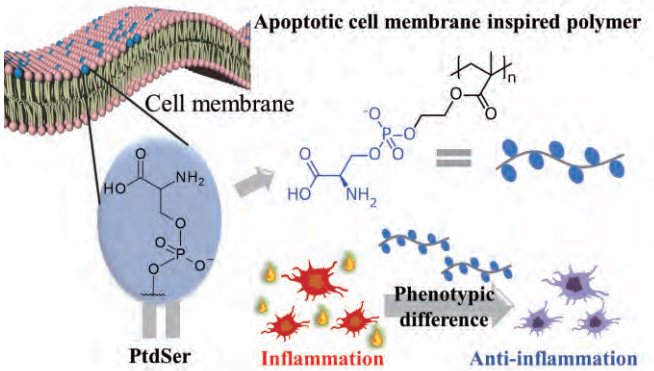


Fig. 1 Schematic illustration of therapeutic effect of apoptotic cell membrane inspired polymer, poly(MPS).

【実験】*N*-Boc-L-serine *tert*-butyl ester, *tert*-butyl tetraisopropylphosphorodiamidite, imidazole hydrochloride を CH_2Cl_2 に溶解させ撹拌した。2-hydroxyethyl methacrylate, imidazole hydrochloride を加え、撹拌、精製し *t*-Bu/Boc-MPS モノマーを得た。*t*-Bu/Boc-MPS モノマーを DMF に溶解し、2,2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)を *t*-Bu/Boc-MPS モノマーに対して 1 mol%加え、36°C で重合を行った。透析により得られた白色粉体を CH_2Cl_2 中に再溶解し、*tert*-butyl hydroperoxide, trifluoroacetic acid を用いて酸化、脱保護を行い、poly(MPS)を作製した。次に、ミクログリア細胞株 (MG-6)を細胞培養液中で培養後、poly(MPS)を添加し、静置した。その後炎症性刺激(リポ多糖類（LPS）)を添加し、ELISA によって炎症性サイトカインである IL-6 の産生量を定量した。

【結果と考察】重合反応後に得られた白色固体を ^{1}H-NMR スペクトルを測定したところ、5.5-6.0 ppm に存在していたビニル基由来のピークが消失し、重合が進行したことを確認した。さらに酸化、脱保護後、得られた白色固体を ^{1}H-NMR スペクトルを測定し、1.5 ppm に存在していた *N*-Boc-L-serine *tert*-butyl ester 由来の *t*-Bu 基のピークの消失を確認した。以上の結果より poly(MPS)の合成を確認した。続いて MG-6 培養系に LPS を 5.0 μg/mL の濃度で添加した際、炎症性サイトカインである IL-6 が有意 (920 pg/mL)に産生された (Fig. 2)。一方、MG-6 培養系に poly(MPS) (5.0 mmol/L)を添加した群では、LPS による IL-6 の産生は有意に抑制され、本実験系では IL-6 の検出限界以下であった。以上より、poly(MPS)が有効な抗炎症活性を発現可能な材料として期待できる。

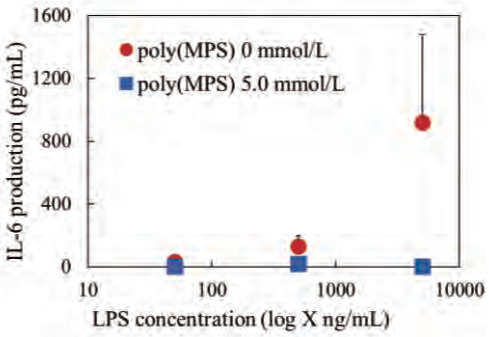


Fig. 2 Suppression of IL-6 production from microglia cells by poly(MPS).

Apoptotic cell membrane inspired polymers towards the improvement of inflammatory environment.

Yuto YANO[1,2], Yasuhiro NAKAGAWA[2,3,4], Akihiko KIKUCHI[1], and Mitsuhiro EBARA[1,2,3]
[1]Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Internt'l Center for Mater. Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science, [3] Grad. Sch. of Pure and Appl. Sci., Univ. of Tsukuba
Tel: +8129-851-3354, Fax: +81-29-860-4708, E-mail: EBARA.Mitsuhiro@nims.go.jp

2E-18

放射線・温熱治療用イットリウム・ホルミウム含有ガーネット型フェライトの作製

[1] 東北大学大学院工学研究科，[2] 東北大学大学院医工学研究科
○松本　晋太朗[1]，小川　智之[1]，川下　将一[2]

【緒言】主ながん治療法としては、外科的療法、放射線療法、化学療法があるが、従来の治療法はいずれも患者の身体に負担をかけるため、より低侵襲な治療法の開発が求められている。そのような低侵襲治療法として、放射性微小球による血管内放射線療法や磁性微小球による血管内温熱療法が提案されている。イットリウム（Y）やホルミウム（Ho）を含んだ微小球に熱中性子線を照射すると、同微小球はβ線を放射するようになる。放射性 Y および放射性 Ho のβ線の飛程および半減期はそれぞれ、約 11 mm および約 9 mm、約 64 時間および約 27 時間と短いため、局所的な放射線治療が可能となる。また、フェライトなどの磁性体を含む微小球は交流磁場下で発熱するため、局所的な温熱治療効果を期待できる。そこで本研究では、放射化可能な元素を含んだ磁性体である、イットリウム鉄ガーネット（$Y_3Fe_5O_{12}$）、および $Y_3Fe_5O_{12}$ の Y の一部を Ho で一部置換した $Y_{3-x}Ho_xFe_5O_{12}$ を作製し、それぞれの交流磁場下での発熱能、および（Y+Ho）/Fe 比を見積もった。

【実験】硝酸イットリウム n 水和物 4.6076 g、硝酸鉄（Ⅲ）9 水和物 8.08 g を超純水 200 ml に溶解させ、これを出発溶液とした。これを 6 M 水酸化ナトリウム水溶液 140 ml に加えて撹拌した。その後、溶液を遠心分離して得られた前駆体沈殿を洗浄、乾燥させた。乾燥後、1400 ℃で 1 時間加熱処理を行い、粉砕処理を行うことにより、試料を得た（試料名：Fe-Y）。また、硝酸イットリウム n 水和物 3.0718 g、硝酸ホルミウム n 水和物 1.7504 g、硝酸鉄（Ⅲ）9 水和物 8.08 g を超純水 200 ml に溶解させた出発溶液を用意し、同様の合成プロセスを経て試料を得た（試料名：Fe-Y-Ho）。各試料の飽和磁化および保磁力を振動試料型磁力計により測定し、磁場強度 300 Oe での磁気ヒステリシスループの面積から、100 kHz、300 Oe の交流磁場下での発熱量を見積もった。また、各試料の（Y+Ho）/Fe 比は、電子プローブマイクロアナライザの分析結果から見積もった。

【結果と考察】Fe-Y および Fe-Y-Ho の飽和磁化はそれぞれ 4.1 emu/g および 5.4 emu/g、保磁力はそれぞれ 79.6 Oe および 25.4 Oe となった。ボーア磁子 μ_B を用いると、Y^{3+}および Ho^{3+}1 個の磁気モーメントはそれぞれ 0 μ_B および 10 μ_B と表されるため、Ho^{3+}を含む Fe-Y-Ho の飽和磁化が Fe-Y のそれよりも大きくなったと考えられる。図 1 に 300 Oe における各試料の磁気ヒステリシスループを示す。これより、Fe-Y および Fe-Y-Ho の発熱量は、それぞれ 7.1 W/g および 20.4 W/g と見積もられた。Fe-Y-Ho は Fe-Y より飽和磁化が大きいため、ループの面積が大きくなり、発熱能が高くなったと考えられる。また、Fe-Y-Ho の（Y+Ho）/Fe 比は、3.02/5 となった。$Y_3Fe_5O_{12}$ の Y/Fe 比は 3/5 であるので、Fe-Y-Ho は $Y_3Fe_5O_{12}$ の Y と同程度の Y および Ho を含み、熱中性子線の照射により $Y_3Fe_5O_{12}$ と同等の放射能を持つと考えられる。以上より、$Y_{3-x}Ho_xFe_5O_{12}$ は良好な発熱能と放射能を併せ持ち、がんの放射線・温熱治療を同時に実現し得る材料として有用であると期待される。

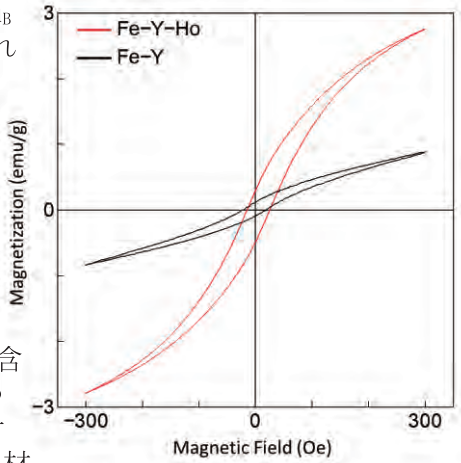


Figure 1 Hysteresis loops of samples under 300 Oe.

Preparation of yttrium and holmium-containing garnet-type ferrite for radiotherapy and hyperthermia

Shintaro Matsumoto[1], Tomoyuki Ogawa[1], Masakazu Kawashita[2]
[1]Graduate School of Engineering, Tohoku University
[2]Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University
Tel: +81-22-795-4735, Fax: +81-22-795-4735, E-mail: shintaro.matsumoto.s4@dc.tohoku.ac.jp

2E-19

悪性度の異なるがんの ECM を模倣した培養基板上での抗がん剤耐性の発現機構

[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
○干場 隆志 [1, 2, 3]

【緒言】
がんはその悪性化とともに抗がん剤耐性を獲得していくことが知られている。一方で、がん細胞周囲の細胞外マトリックス(ECM)も、悪性化に伴いリモデリングを受ける。しかし、悪性化に伴う ECM リモデリングが抗がん剤耐性の獲得にどのように寄与しているかはよくわかっていない。本研究では、転移性の異なる大腸がん細胞株を培養して、培養基板表に細胞が産生した ECM 成分を沈着させた後に、細胞のみを除去すること(脱細胞化)で得た ECM タンパク質を、がんの悪性化によってリモデリングを受けた ECM のモデルとして用い、5-フルオロウラシル(5-FU)耐性の発現機構を検討した。以前、悪性度の高いがん細胞が形成した ECM 上での *ABCB1* の発現上昇が生じ、5-FU 耐性が亢進することを報告した。今回は *ABCB1* の発現亢進における上皮-間葉転換(EMT)の寄与について検討した。

【実験】
大腸がん細胞株である HT-29(転移性)、SW480(非転移性)および正常細胞株である CCD-841-CoN を 2 週間培養後、界面活性剤および核酸分解酵素で処理することにより ECM モデルを得た。その後、HT-29 細胞を播種し、5-FU あるいは TGF-βを添加した後、さらに培養することで各種の検討を行った。また、コンドロイチナーゼ ABC を用い、コンドロイチン硫酸鎖の分解を行った。

【結果と考察】
5-FU を HT-29 細胞に添加すると EMT 関連遺伝子の発現上昇を生じるとともに *ABCB1* の発現も上昇した。この発現上昇は TGF-β受容体の阻害剤である SB431542 により抑制された。さらに HT-29 細胞由来の ECM 上で培養すると *ABCB1* の発現量が他の細胞由来の ECM と比較して高値を示したが、SB431542 により違いは観察されなくなった(右図)。この結果は悪性度の高いがん細胞由来の ECM 上での *ABCB1* の発現には TGF-β シグナルが関与していることを示唆している。同様に、各種のがん細胞由来の ECM 上で HT-29 細胞を培養し、TGF-β添加により EMT を誘導したところ、HT-29 細胞由来の ECM 上で EMT 関連遺伝子が高く観察された。さらにビグリカンを由来とすると考えられる TGF-βを結合するコンドロイチン硫酸(CS)鎖が HT-29 細胞由来の ECM で多く検出された。CS 鎖は TGF-βと結合し、その活性を上方制御している。そこで、HT-29 細胞由来の ECM 中の CS 鎖を分解したところ、*ABCB1* の発現量が低下した。以上の結果から、悪性度の高いがんの ECM では CS 鎖に TGF-βが結合し、より効率よく細胞に提示されることにより EMT を促進し、抗がん剤耐性を上昇することが示唆された。

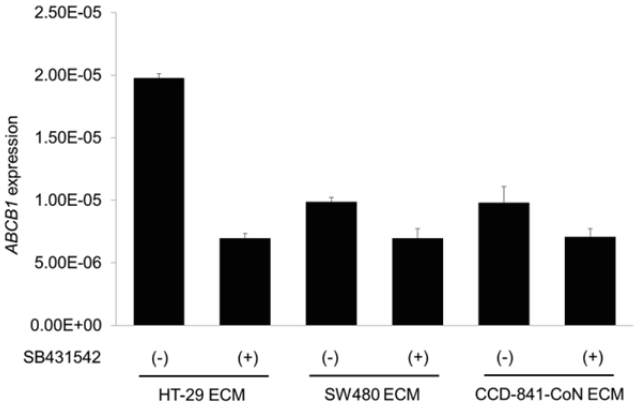


図 : TGF シグナル阻害剤添加時の癌進行模倣型マトリックス上における *ABCB1* の発現

Chemoresistance acquisition mechanism on the substratum mimicking native ECM in tumor at different malignant levels

Takashi Hoshiba[1,2,3]
[1]Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, [2]iFront, Yamagata University, [3]National Institute for Materials Science
Tel: +81-238-26-3585, E-mail: thoshiba@yz.yamagata-u.ac.jp

2E-20

アポトーシス細胞の抗炎症活性を模倣した高分子材料(MPS)の開発

[1]物質・材料研究機構　WPI-MANA，[2]筑波大学大学院　数理物質科学研究科，
[3]東京大学大学院　工学系研究科，[4]大阪大学附属病院　未来医療センター，
[5]日本大学　理工学部物質応用化学科，[6]東京理科大学大学院　基礎工学研究科
○中川　泰宏[1,2,3]，齋藤　充弘[4]，青柳　隆夫[5]，荏原　充宏[1,2,6]

【緒言】　炎症反応の過剰・慢性発現は心疾患やアルツハイマー病などの重篤な疾患の主な原因であることが報告されている。今日ではステロイド薬剤や分子標的薬が抗炎症治療薬剤として使用されているが、近年ではこれらに変わる新たな抗炎症治療担体としてアポトーシス細胞や、それが特異的に提示するリン脂質(ホスファチジルセリン:PtdSer)を含有するリポソームが開発されている。しかし、高コスト・拒絶反応・生体内での挙動制御が困難といった課題を有しており、実用化へ向けたさらなる高機能化が求められている。我々は、アポトーシス細胞の特異的な膜表面構造を模倣した、抗炎症活性を有する材料による新規治療法の開発を目的として、PtdSer の機能性部位である頭部基を有する高分子(poly(MPS))の作製を試みた。(Fig. 1)

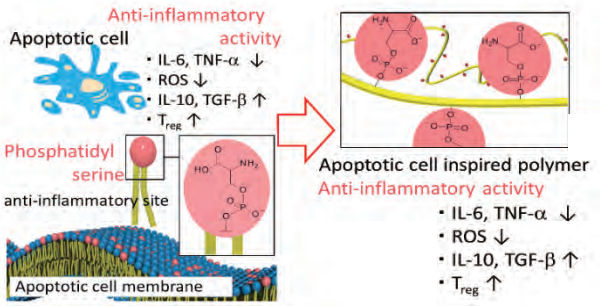


Fig. 1 Schematic illustration of apoptotic cell inspired polymers for anti-inflammation.

【実験】

MPS 及び poly(MPS)の合成

Poly(MPS)の前駆体となるモノマー(MPS)の合成を試みた。DNA の固相合成に用いられるホスホロアミダイト試薬を転用する手法にて、MPS を高収率(78%)で得た。次に、フリーラジカル重合によって、MPS を重合し、*tert*-butyl hydroperoxide で酸化、TFA で脱保護反応を行うことで poly(MPS)を得た。また、同様の手法にて 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)との共重合モデルである poly(MPS-*st*-MPC) (MPS:MPC = 1:9)を合成した。

poly(MPS)の抗炎症活性評価

Poly(MPS)の抗炎症活性を評価した。マウス由来マクロファージ(RAW264.7)に lipopolysaccharide(LPS)を添加し炎症マクロファージモデルを作製し、poly(MPS)及び poly(MPS-*st*-MPC) 添加の有無による炎症活性の変化を評価した。免疫活性定量の指標として免疫反応において中心的役割を果たす転写因子の一つである NF-κB の発現量を SEAP reporter gene assay にて定量した。

【結果と考察】

炎症マクロファージモデルにおいて poly(MPS)、及び poly(MPS-*st*-MPC)添加による用量依存的な NF-κB 発現量の低下を確認した。NF-κB 活性の抑制は細胞の炎症活性の抑制を強くするため、この結果は Poly-MPS が抗炎症活性を有するということを強く示唆する。また、poly(MPS)と比較して poly(MPS-*st*-MPC)の炎症抑制効率がより高いという結果を得た。これは、poly(MPS-*st*-MPC)がアポトーシス細胞膜により近い構造を有することに起因すると考えられる。

Development of Apoptotic Cell Inspired Polymer Materials (MPS) for Immunosuppression

Yasuhiro NAKAGAWA[1,2,3], Saito ATSUHIRO[4], Takao AOYAGI[5], and Mitsuhiro EBARA[1,2,6]
[1] International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science
[2] Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba
[3] School of Engineering, University of Tokyo
[4] Development of Medical Innovation, Osaka University Hospital
[5] College of Science and Technology, Nihon University
[6] Graduate School of Industrial Science and Technology, Tokyo University of Science
Tel: +8129-851-3354, Fax: +81-29-860-4708, E-mail: EBARA.Mitsuhiro@nims.go.jp

2E-21

水熱合成した中性子捕捉療法用ホウ酸ガドリニウムの構造

東北大学大学院医工学研究科
○三上　敬太，川下　将一

【緒言】

現在、日本人の主な死因別死亡数の第一位はがんであり、低侵襲ながん治療法への需要が年々高まってきている。ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、がん細胞に集積させたホウ素化合物に熱中性子線を照射することにより、同化合物がα線を放出し、がん細胞にダメージを与える治療法である。同化合物が放出するα線の飛程は細胞一個分程度(＜10 μm)であるため、正常細胞へのダメージを抑えることができる。BNCT と同様のコンセプトの治療法として、ガドリニウム(Gd)化合物を使用した中性子捕捉療法(GdNCT)がある。Gd は、熱中性子線照射により、飛程 100 μm 以下のγ線を放出する。このγ線の飛程は BNCT においてホウ素化合物が発生するα線のそれより長いが、Gd 化合物は核磁気共鳴画像法(MRI)の造影剤としても働くので、MRI によって同化合物のがん細胞への集積や治療の有効性を確認できる。そこで本研究では、BNCT と GdNCT 双方の効果を期待し得るホウ酸ガドリニウム($GdBO_3$)の作製を目的とする。

【実験】

57 mM の塩化ガドリニウム水溶液 35 mL に 10 wt%の水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液を加えることにより、その pH を 7、10 あるいは 13 に調整した。pH 調整した $GdCl_3$ 水溶液に、0.2 M のホウ酸(H_3BO_3)水溶液 20 mL を加え、30 分間撹拌した。この溶液を 200℃あるいは 240℃で 24 時間水熱合成した。水熱合成終了後、溶液温度が室温程度に下がるまで待ち、遠心分離した。遠心分離して得られた沈殿物を、蒸留水とエタノールで二回洗浄した後、真空乾燥したものを試料とした。得られた試料を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察し、試料の結晶相を粉末 X 線回折装置(XRD)により調べた。

【結果および考察】

得られた試料の XRD パターンを図 1 に示す。pH 7 あるいは 10 の $GdCl_3$ 水溶液を用い、200℃で水熱合成した試料においては、$GdBO_3$、水酸化ガドリニウム($Gd(OH)_3$)および塩化ナトリウム(NaCl)が生成した。一方、pH 13 の $GdCl_3$ 水溶液を用い、同様に 200℃で水熱合成した試料においては、$Gd(OH)_3$ のみが生成した。NaCl の生成は試料洗浄が不十分だったためと考えられる。$Gd(OH)_3$ の生成に関しては、出発溶液に多量の水酸化物イオン(OH^-)が存在することにより、水熱合成の過程において $Gd(OH)_3$ の $GdBO_3$ への変化が妨げられたためと考えられる。pH 10 の $GdCl_3$ 水溶液を用い、240℃で水熱合成した試料においては、$GdBO_3$ のみが生成した。以上より、240℃で水熱合成すれば、$Gd(OH)_3$ から $GdBO_3$ への変化を促進できることが分かった。

pH 10 の $GdCl_3$ 水溶液を用い、240℃で水熱合成した試料の SEM 観察によれば、同試料は、直径約 20 μm、厚さ約 10 nm の円盤状結晶の凝集体であり、その粒径は約 30 μm であった。BNCT および GdNCT においては、5～200 nm 程度の大きさの粒子が望ましいとされている。従って、今回得られた約 30 μm の $GdBO_3$ 粒子をそのまま BNCT や GdNCT に用いることは難しい。水熱合成時の粒成長を抑えるためには、ポリエチレングリコール等の高分子を加える必要があると考えられる。

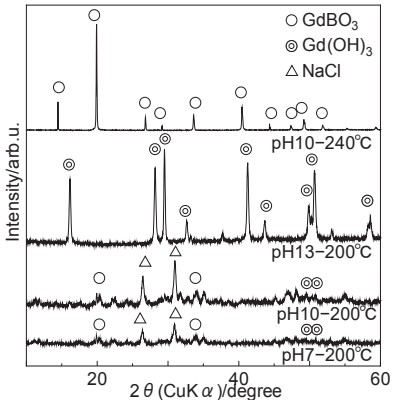


図 1　種々の pH の $GdCl_3$ 水溶液を用い、種々の温度で水熱合成した試料の X 線回折パターン

Structure of hydrothermally synthesized gadolinium borate for neutron capture therapy

Keita Mikami, Masakazu Kawashita
Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University
Tel: +81-22-795-4735 Fax:+81-22-795-4735, E-mail:keita.mikami.r8@dc.tohoku.ac.jp

2E-22

分解後に酸性有機化合物の生成しないポリトリメチレンカーボネート誘導体の合成

[1] 奈良先端科学技術大学院大学　物質創成科学領域，[2] 奈良先端科学技術大学院大学　研究推進機構
○網代　広治[1,2]，Nalinthip Chanthaset[1]，信岡　宏明[1]，前原　明梨[1]

【緒言】

超高齢社会を迎え、新しい医療材料の開発は急務と言える。生分解性高分子であるポリトリメチレンカーボネート(PTMC) へ機能性置換基が導入された高分子が、数多く報告されている。我々はこれまでに、炎症のリスクなどを低くすることを目的として、分解しても酸性有機化合物が生成しない、エステルフリー型構造にこだわって分子設計してきた。例えば、3 ユニットのオリゴエチレングリコール鎖を有する TMCM-MOE3OM (Figure 1a)では、ホモポリマーが 33℃に感熱応答を示す。

本研究では、このエステルフリー型構造が示す特徴を、エステル基を有する類似構造 MTC-MOE3OM (Figure 1b)の高分子と比較して、加水分解後の分析について考察した。さらに、合成が多段階で煩雑であるという問題に対しても、新しく開発した合成経路を、様々な置換基導入に適用した結果について考察し、当該エステルフリー型 PTMC 誘導体の合成について検討したので報告する。

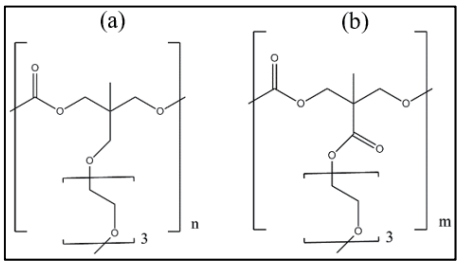


Figure 1. Polymer structure of ester-free poly (TMCM-MOE3OM) (a) and poly(MTC-MOE3OM) containing ester structure (b).

【実験】

エステルフリー構造を有する poly(TMCM-MOE3OM) [1]と、これのモデルとしてエステル構造を有する poly(MTC-MOE3OM) [2]を合成した。これらのポリマーは 20 mg ずつイオン交換水 13mL に溶解させ、リパーゼ(0.005 mM)あるいは、水酸化ナトリウム(0.003 mM)によって加水分解を促進させた(n= 3)。これらの水溶液は、それぞれ 30 日間 pH を測定した。

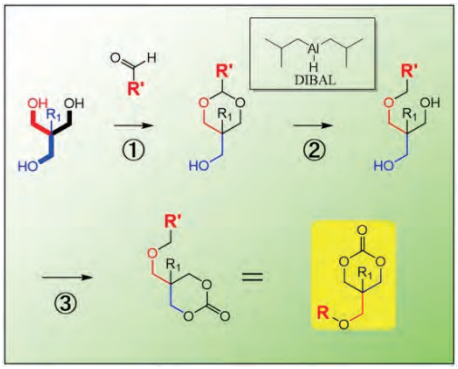


Figure 2. Novel synthetic route for ester fee type trimethylene carbonate derivatives.

【結果と考察】

酵素やアルカリ条件によって加水分解した場合、poly(TMCM-MOE3OM)の場合では、そのブランクサンプルの場合とほぼ同じ pH の値を示したのに対して、エステル構造を有するモデルポリマーpoly(MTC-MOE3OM)での場合では、常に酸性を示し、特に実験開始直後では大きく酸性に偏る結果となった。したがって、エステルフリー構造を持つ TMC 誘導体のポリマーが分解時に酸性有機化合物を放出せず、より生体適合性を示すことを示唆している。また Figure 2 に、当該エステルフリー型 PTMC 誘導体の合成について、最近開発した合成スキームを示す。出発物質としてトリオールを用いること、さらにアルデヒド化合物を用いることを条件として、様々なアルデヒド化合物を試した結果、現在 6 種類以上のエステルフリー型 TMC 誘導体の合成に成功した。Figure2 に示す合成経路は、比較的汎用性に優れた合成法と考えられる。

[参考文献][1] H. Ajiro, Y. Takahashi, M. Akashi, Macromolecules 2012, 45, 2668. [2] R.C. Pratt, F. Nederberg, R.M. Waymouth, J.L. Hedrick, Chem. Commun. 2008, 114.

Synthesis of poly(trimentylene carbonate derivatives) which do not produce acidic organic compounds after hydrolysis

Hiroharu Ajiro[1,2], Nalinthip Chanthaset[1], Hiroaki Nobuoka[1], Akari Maehara[1]
[1]Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology. [2]Institute for Research Initiatives, Nara Institute of Science and Technology
Tel: +81-(0)743-72-5508, Fax: +81-(0)743-72-5509, E-mail:ajiro@ms.naist.jp

2E-23

固相メカノケミカル反応を利用した双性イオンを有する機能性高分子の開発

[1] 岐阜薬科大学薬物送達学大講座薬品物理化学研究室，[2] 松山大学薬学部薬品物理化学研究室，[3] 中部学院大学人間福祉学部
○土井　直樹[1]，杉山　航平[1]，池上　遼[1]，笹井　泰志[1]，山内　行玄[2]，葛谷　昌之[3]，近藤　伸一[1]

【緒言】双性イオン型高分子は、正・負両電荷のベタイン構造を有する高分子であり、生体内の細胞膜を構成する Phosphatidylcholine を模倣していることから、生体適合性を持つバイオマテリアルに広く利用されている。しかし、双性イオン型高分子は高い水和効果を示すことから、親水性鎖と疎水性鎖から成るブロックあるいはグラフト共重合体の合成に際し、使用可能な溶媒が限定的であるために、疎水性の高い高分子鎖の導入が困難である。ところで、当研究グループはこれまでに、室温窒素雰囲気下、高分子に機械的なエネルギーを加えることで高分子の主鎖切断により惹起されるメカノラジカルについて、電子スピン共鳴（ESR）スペクトル測定を行い、その詳細なスペクトルシミュレーション解析により、生成メカノラジカルの構造特性について世界に先駆け報告してきている。さらに、高分子と固体モノマーとの混合粉末を高速ボールミル振動処理することで、高分子のメカノラジカルがイニシエーターとして働き、固体モノマーの固相重合が進行することにより、ブロックあるいはグラフト共重合体が得られることを明らかにしている。そこで本研究では、双性イオン型高分子と pH 応答能を持つ疎水性固体モノマーとの固相メカノケミカル反応により、双性イオンを有する新規な機能性高分子を合成した。発表では、本反応の動力学的特性ならびに生成高分子の物理化学的特性に関する結果を報告する。また、透析膜法を用いた生成高分子の自己組織化ならびに、pH の変化によるその崩壊特性を検討した結果についても併せて報告する。

【実験】まず、Glycidyl methacrylate を水中にて 80 ℃ で 9 時間撹拌することにより開環した後、過ヨウ素酸ナトリウムを加え、室温で 2 時間撹拌することで、2-Oxoethyl methacrylate を合成した。続いて、弱酸性の pKa (= 5.62) を有する Pyridine を構造中に含む Isoniazid との縮合反応により、pH 応答能を有する新規な疎水性固体モノマーである 2-(2-isonicotinoyl-hydrazono)ethyl methacrylate (INHMA) を合成した。INHMA (50～20 mol%) と Poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) の混合粉末について、室温窒素雰囲気下、非金属製の容器およびボールを用いた高速ボールミル振動処理（振動数 30 Hz）を種々の時間実施した。経時的な反応率について評価するため、生成物の ^{1}H-NMR 測定を行い、INHMA のオレフィンに基づくプロトンピークの減少率から反応率を算出した。また、ゲルろ過クロマトグラム (GPC) 測定を用いて、生成高分子 (PMPC-*b*-PINHM) の分子量ならびに分子量分布を評価した。次いで、10 時間の反応により得られた PMPC-*b*-PINHM をメタノールあるいは DMF に溶解させ、外相として pH 7.4 のリン酸緩衝液を用いた透析膜法による自己組織化を検討した。生成ナノ粒子の流体力学的サイズは、動的光散乱 (DLS) 法により評価した。さらに詳細な粒子形態について明らかにするため、リンタングステン酸を用いたネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡像 (TEM) を観察した。また、種々の pH (7.4～5.1) の水溶液中における、ナノ粒子のサイズの経時変化について DLS 測定により明らかにすることで、粒子の安定性ならびに崩壊特性を詳細に検討した。

【結果と考察】^{1}H-NMR, IR, UV, HR-MS (ESI), 元素分析の結果より、pH 応答能を有する新規な疎水性固体モノマーである INHMA の生成を確認した。また、PMPC と INHMA との固相メカノケミカル反応は、反応時間に従い反応率は上昇し、10 時間で 73% の反応率を示した。次いで、経時的な生成高分子について、ゲルろ過クロマトグラフ測定を実施したところ、10 時間後の生成高分子は数平均分子量が 35,000, 多分散度が 1.82 であり、反応時間に伴い分子量の指数関数的な低下がみられ、長時間粉砕により限界分子量へと近づく結果が示された。透析膜法により得られた PMPC-*b*-PINHM から成るナノ粒子の DLS 測定より、その平均流体力学径は 120 nm であり、いずれの散乱角においても拡散係数は一定であったことから、球形の形態をとることが示唆された。また、比較検討として、pH 7.4 の 100 mM リン酸緩衝液あるいはメタノールに溶解した PMPC に

ついても DLS 測定を行ったところ、散乱強度によらず粒子サイズは観測されなかったことから、PMPC-*b*-PINHM から成る生成ナノ粒子は、PINHM 鎖の疎水性相互作用により自己組織化していることが示唆された。生成ナノ粒子は、室温における pH 7.4 のリン酸緩衝液中にて、1 週間以上一定の粒子サイズを維持した。そして、水溶液の pH の低下に伴い、生成ナノ粒子の粒子サイズは段階的に低下していき、pH 5.1 の酢酸緩衝液中において完全な粒子の崩壊が認められた。以上の結果より、本研究は、双性イオン型高分子と pH 応答能を持つ疎水性固体モノマーとの固相メカノケミカル反応により、溶媒ならびに開始剤を一切加えることなく、双性イオンを有するブロック共重合体が合成可能であることを明らかにするとともに、生成高分子は pH 応答能を有する高分子キャリアとして有用であると考えられる。

Development of pH-responsive zwitterionic block copolymers prepared by mechanochemical solid-state copolymerization

Naoki Doi[1], Kohei Sugiyama[1], Ryo Ikegami[1], Yasushi Sasai[1], Yukinori Yamauchi[2], Masayuki Kuzuya[3], Shin-ichi Kondo[1]
[1]Laboratory of Pharmaceutical Physical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University
[2]Department of Pharmaceutical Physical Chemistry, College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University
[3]Department of Health and Welfare, Faculty of Human Welfare, Chubu Gakuin University
Tel: +81-58-230-8100, Fax: +81-58-230-8114, E-mail: doi@gifu-pu.ac.jp

2E-24

生体組織付着型薬剤徐放材料への応用を志向した擬ポリロタキサンナノシートの創成

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
○前田利菜、上沼駿太郎、小林諒太、河西健吾、横山英明、伊藤耕三

1. 諸言

グラフェン、酸化チタン、二次元ポリマーなどに代表される二次元ナノシートは、その特異な表面電子状態や力学物性、高い比表面積を有する特徴を生かして薬剤輸送、生体材料などへの応用開発が進んでいる。一方、我々の研究室では直鎖ポリマーがシクロデキストリンに貫通することで得られる擬ポリロタキサンの自己組織化構造に注力して研究をしており、近年末端に電荷官能基を有する poly(ethylene glycol)-*b*-poly(propylene glycol)-*b*-poly(ethylene glycol) (PEO-PPO-PEO)とシクロデキストリン(CD)からなる擬ポリロタキサンが水中で剥離されたナノシート構造を自己組織的に形成することを見出した。末端に電離基を有さない擬ポリロタキサンは、分子間力によりナノシート同士が水中でお互いに吸着し層状構造を形成する。一方、擬ポリロタキサンの軸分子末端に電離基を導入すると、ナノシート同士に電荷反発が生じ、剥離したナノシートが得られたと考えられる。また、各成分の重合度の分布が揃った PEO-PPO-PEO を軸分子として用いているため、CD が包接する数と軸上での位置が決定され、厚さ 10-20nm、1 片が数μm の単結晶状の単離ナノシート（擬ポリロタキサンナノシート）が得られた。さらにこの擬ポリロタキサンナノシートは、(1)pH などの環境変化によって構造形成と崩壊を制御できること、(2)非特異的相互作用および特異的相互作用により固体表面に吸着すること、(3)ナノシート構造形成時に色素分子などの異種低分子を投入すると、低分子を取り込んだナノシートが得られること、(4)希薄条件下で取り込んだ異種低分子を徐放しながらナノシートが崩壊することがわかった。以上の特徴を踏まえて我々は、この新規擬ポリロタキサンナノシートを生体組織に付着して薬剤を徐放する新しい薬剤徐放材料としての応用を考えている。本発表では、擬ポリロタキサンナノシートの合成法や上記特徴に関する研究結果をまとめて紹介する。

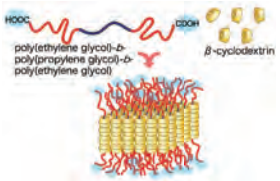


Fig. 1. Schematic illustration of pseudo-polyrotaxane nanosheet.

2. 実験および結果と考察

両末端にカルボン酸を有する PEO-PPO-PEO とβ-CD を水中で混合することにより、目的の擬ポリロタキサンナノシートを得た。ナノシートの構造解析は、小角 X 線散乱(SAXS)、広角 X 線回折測定法、走査型電子顕微鏡、および原子間力顕微鏡(AFM)観察により行った。Fig. 1 に示した模式図のように、両末端カルボン酸を有する PEO-PPO-PEO がシクロデキストリンの穴に貫通し、シクロデキストリンが軸高分子上で結晶化することによりナノシート構造を形成していることが明らかになった。得られた単離ナノシートがシリコン基板に付着している様子の AFM 観察結果を Fig. 2 に示す。厚さが 16nm、大きさが 1-2μm のナノシートが得られたことがわかった。また、シリコン基板に付着したナノシートの崩壊過程を走査型電子顕微鏡により観察したところ、ひし形状ナノシートの内部から結晶面に沿って構造が崩壊する様子が観察された。当日はモデル低分子として選択したローダミンを取り込んだ擬ポリロタキサンナノシートの作製や希薄条件下におけるナノシート崩壊に伴う低分子徐放挙動についても報告する。

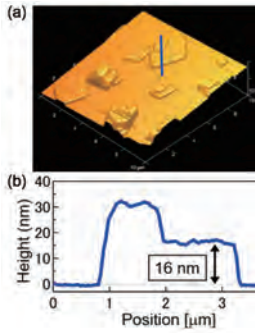


Fig. 2. AFM height image (a) and cross section profile (b) of pseudo-polyrotaxane nanosheet.

Bioadhesive pseudo-polyrotaxane nanosheet for controlled drug release

Rina Maeda, Shuntaro Uenuma, Ryota Kobayashi, Kengo Kasai, Hideaki Yokoyama, and Kohzo Ito (Graduate school of Frotier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa-shi, Chiba 277-8561, Japan) Tel: +81-4-7136-3757, Fax: +81-4-7136-3757, E-mail: rmaeda@edu.k.u-tokyo.ac.jp

ポスター発表

第 1 日: 11 月 12 日（月）

1P-001

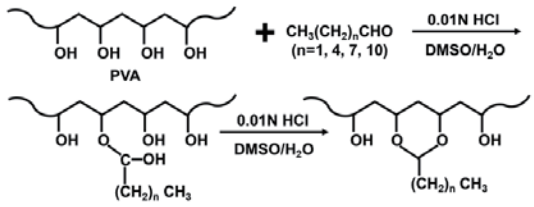
アセタール化 PVA コーティング表面の抗血栓形成性評価

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

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

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

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



Scheme 1. Synthesis of Hm-PVAs.

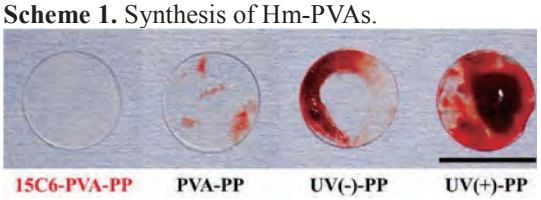


Figure 1. Anti-thrombogenic test using C6-PVA-PP, PVA-PP, UV(-)-PP and UV(+)-PP. Scale bar = 10mm.

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

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

Acetalized poly (vinyl alcohol)s as antithrombogenic materials

Xi Chen [1,2], Tetsushi Taguchi [1,2*]
([1]Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan [2] Biomaterials Field, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan)
Tel: +81-29-860-4498; Fax: +81-29-860-4714; E-mail: TAGUCHI.Tetsushi@nims.go.jp (T. Taguchi).

1P-002

Effects of alkaline treatment to silicones for biocompatible crosslinked polymer coatings

[1] The University of Tokyo, [2]Fuji-Systems Corporation
◯ FangYu Chou[1], Keiichiro Kushiro[1], Ryo Yokoi[2], Shintaro Hara[1], Takashi Isoyama[1], Masaki Anraku[1], Madoka Takai[1]

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

【Experiment】 Silicone plates for medical applications were used as model substrates. The coating polymer was composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), 3-(methacryloyloxy) propyl-tris(trimethylsilyloxy) silane (MPTSSi) and 3-methacryloxypropyl trimethoxysilane (MPTMSi) with the molar ratios of 54/27/19 = MPC/MPTSSi/MPTMSi. This crosslinking-type MPC copolymers were synthesized by free radical polymerization. The traditional O_2 plasma treatment was replaced by alkaline solution treatments at different temperatures in an attempt to improve reactivity of the silicone surfaces. The silicone surfaces were hydroxylated by alkaline treatments, then were coated with the 0.1wt% polymer in methanol by silane-coupling reactions. For polymer coating analyses, silicone substrates were stained by fluorescent molecule rhodamine 6G that specifically bind to MPC to evaluate the relative amount of polymer on the surface, and in addition, water contact angle measurements were conducted. For protein adsorption analysis, the relative values of adsorbed bovine serum albumin (BSA) could be analyzed from ImageJ via the fluorescence microscopy images; a substrate that shows increased intensity indicates higher levels of protein adsorption onto the surface. We evaluated the biocompatibility of coating via alkaline treatment by evaluating the viability of human lymphoblasts (CCRF) via the live/dead assay.

【Results and discussion】 The rhodamine staining and contact angle measurements of polymer-coated silicone plates using various pre-treatment methods (Fig. 1A) showed successful polymer coating on the silicone plates after being treated by alkaline solutions. The fluorescence intensities of BSA adsorbed on coated plates (Fig. 1B) demonstrated successful prevention of protein adsorption onto the coated surfaces. The protein adsorption on alkaline-treated substrates were higher than that of O_2-plasma-treated ones, because the roughness of silicone plate after being treated by alkaline solutions, which etch silicones, were greater than O_2-plasma-treated plates, which was confirmed by scanning electron microscopy. The higher roughness presumably increased the area available for protein adsorption. Interestingly, increasing the temperature of Alkaline treatments resulted in more polymer attachment but reduced protein repelling, which may be due to the etching of the silicones being greater at the high temperature. Also, cell/substrate compatibility was observed by culturing cells with the substrates for 3 days (Fig. 2). The cell viability on substrates coated after alkaline treatments was high (>99%) and same as the viability on coatings via O_2 plasma treatment. In conclusion, the biocompatible, crosslinked polymer could be successfully coated on silicones via alkaline treatments, and it prevented protein adsorption. The coating procedure with alkaline treatments on silicones is easier, more scalable than oxygen plasma treatment and it can be applied to various medical devices with complicated shapes.

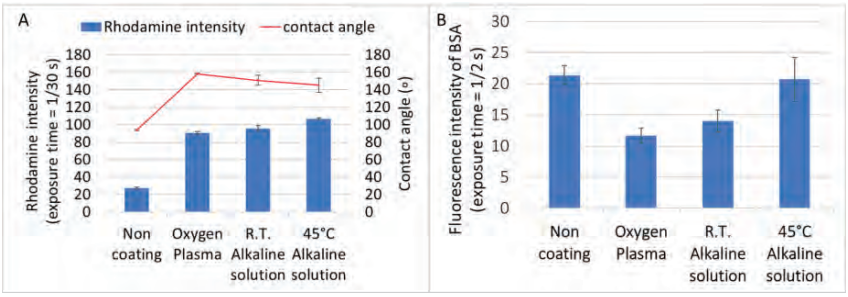


Figure 1. (A) Rhodamine-staining intensities and contact angles and (B) protein adsorption on polymer-coated silicones.

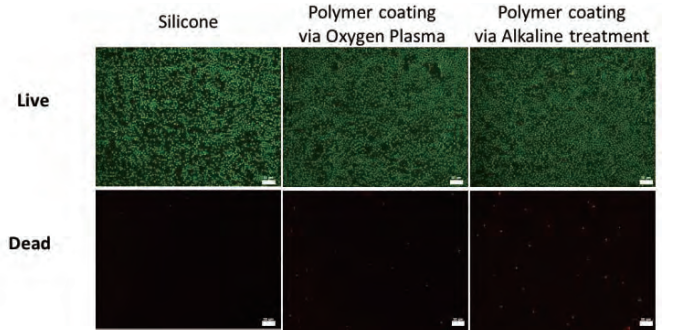


Figure 2. Toxicity determination using the live/dead viability assay (Scale bar = 50 μm).

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

Effects of alkaline treatment to silicones for biocompatible crosslinked polymer coatings
FangYu Chou[1], Keiichiro Kushiro[1], Ryo Yokoi[2], Shitaro Hara[1], Takashi Isoyama[1], Masaki Anraku[1], Madoka Takai[1]
[1]The University of Tokyo, [2]Fuji-Systems Corporation
Tel: +81-03-6841-2959, Fax: +81-03-5841-0621, E-mail: chou@bis.t.u-tokyo.ac.jp

1P-003

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

[1]東京医科歯科大学　循環生理解析学，[2]東京医科歯科大学難治疾患研究所　生体情報薬理学，
[3]愛知学院大学歯学部解剖学，[4]東京医科歯科大学　循環制御内科学
○千葉　里沙子[1]，山添　正博[2]，井原　健介[2]，小室　博明[1]，永井　亜希子[3]，田村　典子[4]，
平尾　見三[4]，古川　哲史[2]，笹野　哲郎[1]

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

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

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

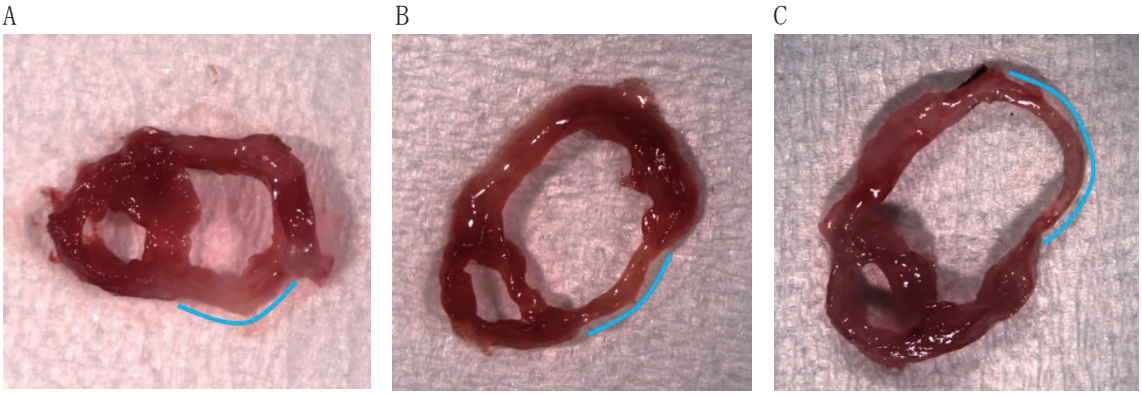


図 1. TTC 染色を行った組織(青線部が梗塞領域) (A)HA-E1 群 (B)HA-E10 群 (C)C 群

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

Risako CHIBA[1], Masahiro YAMAZOE[2], Kensuke IHARA[2], Hiroaki KOMURO[1], Akiko NAGANO[3], Noriko TAMURA[4], Kenzo HIRAO[4], Tetsushi HURUKAWA[2], Tetsuo SASANO[1]
[1]Department of Cardiovascular Physiology, Tokyo Medical and Dental University, [2]Department of Bio-informational Pharmacology, Medical Research Institute Tokyo Medical and Dental University, [3]Department of Anatomy, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, [4]Department of Cardiovascular Medicine, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5803-5365, Fax: +81-3-5803-5365, E-mail: ma180050@tmd.ac.jp

1P-004

高分子材料の血液適合性評価マーカの性能検証

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

【緒言】生体内に埋植した医用材料は吸着蛋白質層を介して細胞・組織と相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与する。我々は、高分子材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から予測する新規評価法の確立と標準化を目指し、産官学連携のもとに研究を推進してきた。本研究では、これまでに選定した血液適合性評価用 1 次マーカ候補（VTNC）及び 2 次マーカ候補（C3a、C1s）の有用性を更に検証するため、血液適合性の異なる種々の高分子材料をそれぞれ内面コーティングした拍動循環閉鎖系血液回路を作製し、血液循環に伴う回路内面への蛋白質吸着挙動を解析した。また、候補マーカの再現性、頑健性を検証するため、開放実験系を用いた 5 機関による国内ラウンドロビン（RR）テストを実施した。
【実験】材料としては、血液適合性の異なる 3 群 9 種類の高分子（血液適合性：1 群>2 群>3 群、1 群：PMEA, PEt2A, PMC3A, 2 群：PEt2MA, PMC6A, PEtEA, 3 群：PEA, PBuA, PEtEMA)、並びに PMPC（陰性対照）を使用した。閉鎖実験系では、拍動ポンプを組み込んだ内容量 55 mL の閉鎖型回路の内面を高分子材料で各々コーティングし、ヒト血液を充填後、平均血液流量 100 mL/min、平均圧力 70 mmHg で 37℃下 1 時間循環させた。回路内面の吸着蛋白質は、PBS 洗浄後、M-PER 試薬を用いて回収した。得られた蛋白質試料は、常法に従って、LC-MS/MS ショットガン解析並びに多変量解析に供した。RR テスト用材料としては、PMEA、PEt2A、PMC3A、PEtEA、PEA を選定した。各材料を各々両面コーティングした PC シート（直径 33 mm）をそれぞれ個別にヘパリン加ヒト血漿に浸漬（37℃/1 時間）した後、PBS 洗浄し、M-PER 試薬を用いて吸着蛋白質を回収した。得られた試料は Spin-X UF（Cut Off = 5 kDa）により濃縮した後、ELISA 測定に供した。
【結果と考察】閉鎖型回路内面に吸着した蛋白質の回収量は、303.5 - 1,612.7 μg/回路であり、各群の回収量自体に相関性は認められなかった。各回路から回収した蛋白質の網羅的プロテオミクス比較定量解析の結果、VTNC については、その吸着量が 1 群<2 群<3 群の順に大きくなり、血液適合性評価用 1 次マーカとしての有用性が検証された。C3a は回路接続部分に形成された血栓の影響を受け易く、吸着量が比較的高値となる傾向が認められたが、基本的には材料の血液適合性に応じた吸着挙動を示した。吸着量の少ない C1s は検出されなかった。開放実験系を用いた RR テストにおいて、VTNC は 1 群<2 群<3 群の順に吸着量が増加し、1 次マーカとしての再現性・頑健性が検証された。C1s の吸着量にも同様の傾向が認められたが、同じ 1 群に分類される PMEA 及び PEt2A と比較して、PMC3A への C1s 吸着量は若干高値を示した。また、C3a 吸着量は PMEA=PEt2A <PMC3A=PEtEA=PEA の順であったが、補体マーカの測定結果は試験機関間差のばらつきが大きいことが確認された。これらの成績から、高分子材料の血液適合性は、これらのマーカを利用して評価可能であるが、実製品の試験にあたっては、PMPC 等の陰性対照と比較評価する必要があることが明らかとなった。

Performance verification of markers to evaluate blood compatibility of polymer materials

Yuji Haishima[1], Yuki Inoue[2], Kei Sameshima[3], Yuki Matsuhashi[3], Yoshinori Honobe[3], Chie Fukui[1], Hitomi Toida[1], Yusuke Nomura[1], Yuki Morishita[1], Haruka Hirai[4], Shingo Kobayashi[4], Shinko Hata[5], Akihiko Morishita[5], Kinuko Zaizen[6], Hideki Miyaura[7], Kumiko Kitta[8], Hitomi Matsuda[9], Masaru Tanaka[4], Kiyotaka Iwasaki[3], Kazuhiko Ishihara[2]
[1]National Institute of Health Sciences, [2]The University of Tokyo, [3]Waseda University, [4]Kyushu University, [5]Ig-M, [6]LSI Medience, [7]Chemical Evaluation and Research Institute, [8]CMIC Pharma Science, [9]Nissei Bilis
Tel: +81-44-270-6540, Fax: +81-44-270-6611, E-mail: haishima@nihs.go.jp

1P-005

カチオン性疎水性ポリマーを用いたヘパリンの高分子表面への固定化

○西村　嘉純[1]、中路　正[2,3]、松村　和明[1]

北陸先端科学技術大学院大学[1]、富山大学大学院理工学研究部[2]、富山大学大学院生命融合科学教育部[3]

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

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

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

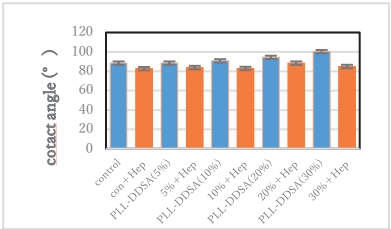


Figure 2Contact angle measurement in each sample

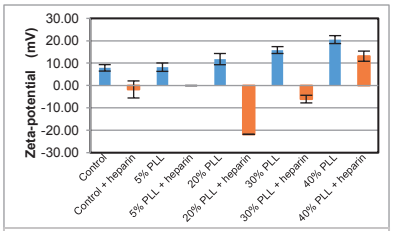


Figure 1 Measurement of ζ potential in each sample

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

Immobilization of heparin on polymer surface using cationic hydrophobic polymer

Kazumi Nishimura[1], Tadashi Nakaji-Hirabayashi[2,3], Kazuaki Matsumura[1]

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

1P-006

電気化学処理による抗菌性と硬組織適合性を両立したチタン表面の創製

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

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

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

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

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

Masaya Shimabukuro[1], Yusuke Tsutsumi[2], Risa Yamada[1], Maki Ashida[2], Peng Chen[2], Hisashi Doi[2], Kosuke Nozaki[2], Takao Hanawa[2]
[1]Graduate School of Medical and Dental sciences, Tokyo Medical and Dental University
[2]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8011, E-mail: shimabukuro.met@tmd.ac.jp

1P-007

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

明治大学大学院　理工学研究科
○上田　綾乃，本田　みちよ，相澤　守

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

【実験】　アパタイトファイバー（AF）の合成［1］および多孔質 HAp セラミックスの作製［2］は、既報にしたがって行なった。得られた多孔質 HAp セラミックスを、1000 ppm の IP6 溶液 5 cm^3 に浸漬し、減圧脱気を行なった後、 37℃ で 24 時間静置した。さらに、濃度を 0, 50, 100, 300, 500 $mmol \cdot dm^{-3}$ に調製した塩化亜鉛（$ZnCl_2$）水溶液に浸漬させ、15 分間減圧脱気を行ない、亜鉛イオン固定化多孔質 HAp セラミックスを作製した。なお、サンプルの略号は、「Zn(X)」と表記し、カッコ内の X は浸漬させた $ZnCl_2$ 溶液の濃度である。材料特性評価として、X 線回折法（XRD）による結晶相の同定、走査型電子顕微鏡法（SEM）による微細構造の観察、誘導結合プラズマ発光分光分析法 （ICP-AES)による元素の定量分析を行なった。 また、HEPES 緩衝液を用いた亜鉛イオンの溶出試験を行なった。作製した試料片の抗菌性評価は、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）と大腸菌（*E. coli*）を用いて阻止円法により行なった。

【結果と考察】　得られた試験片は亜鉛濃度にかかわらず HAp 単一相であり、SEM 観察からは、繊維状の AF 同士が絡み合って焼結していることが分かった。また、気孔率は約 70% であった。次に、亜鉛イオン固定化多孔質 HAp セラミックスの各 $ZnCl_2$ 濃度における亜鉛吸着量を図 1 に示す。濃度に依存して亜鉛の吸着量が増加した。HEPES 緩衝液での亜鉛イオン溶出試験の結果から、亜鉛吸着量が多い試験片ほど亜鉛イオンの溶出量も多いことが分かった。また、浸漬時間の増加とともに溶出量は増加し、浸漬後 6 時間で溶出する亜鉛量はプラトーに達した。図 1 の結果と比較すると、Zn(500) の亜鉛固定化多孔質 HAp セラミックスに吸着している亜鉛量の約 21%が溶出していた。抗菌性試験の結果より、Zn(300), (500) は *S. aureus* および *E. coli* のどちらの菌種に対しても、抗菌性を発現することが分かった。この結果は、抗菌剤である亜鉛イオンが試料片から溶解し、菌の生育を妨げたためであると考えられる。さらに、亜鉛イオン担持量が増加すると、阻止円が大きくなることも明らかになった。これらの結果より、IP6 のキレート能を利用すると、多孔質 HAp セラミックスに亜鉛イオンを固定化できることが明らかになった。また、この試料片は *S. aureus* および *E. coli* に対して抗菌性を発現したことから、術後感染を防止する新規な抗菌性人工骨としての応用が期待できる。

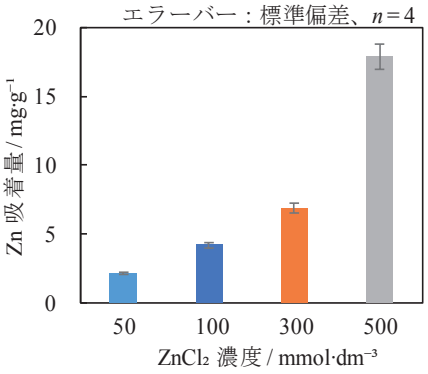


図 1. 多孔質 HAp セラミックスへの亜鉛吸着量

[1] M. Aizawa *et al., Biomaterials*, **26**, 3427-3433(2005).
[2] M. Kawata *et al., J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **15**, 817-823(2004).

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

Ayano Ueda, Michiyo Honda, Mamoru Aizawa
School of Science and Technology, Meiji University
Tel: +81-44-934-7237, E-mail : mamorua@meiji.ac.jp

1P-008

三次元積層造形による連通孔をもつアルミナ多孔質焼結体の作製

[1] 東京工業大学 物質理工学院 材料系
○横井　理史[1]，生駒　俊之[1]

【緒言】

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

【実験】

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

【結果と考察】

ρA+3S では 31.2%のエチレン-酢酸ビニル共重合体が含まれていることが分かった。ρA+3S を用いて作製した成形体（ϕ5.0 mm×高さ 10mm）の圧縮強度は 248 kPa であり、焼結後は 3.54 MPa となった。A018 を混合した粉末を用いると成形体は 226 kPa であり、焼結体は 5.44 MPa まで向上した（図 1）。焼結後の気孔率はそれぞれ 79.9%と 74.6%であった。XRD により結晶相を同定した結果、成形体を湿潤環境下に静置することで針状の水和物が析出し、複雑に絡み合っていることが分かった。さらに、焼結することで相転移が起こりα-アルミナ焼結体が得られた。焼結体の内部構造を観察した結果、粒子間のネットワークに 10～30 μm の隙間がある多孔構造が観察された。また、α-アルミナ微小粒子を混合することによってネックが成長し、これにより焼結後の強度が上昇したと考えられる。多孔質な立方体の成形体では、直径 1 mm の孔を連通させることができた。孔の直径は、造形の方向（X, Y, Z 方向）に対してそれぞれ 0.89±0.07 mm、1.04±0.06 mm、1.01±0.02 mm であった。

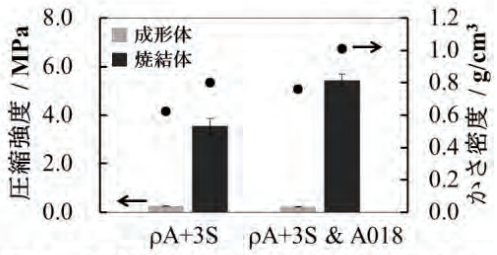


図1　成形体と焼結体の圧縮強度と密度

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

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

Satoshi Yokoi[1], Toshiyuki Ikoma[1]
[1]Department of Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology
Tel: +81-03-5734-3960, Fax: +81-03-5734-3369, E-mail: tikoma@ceram.titech.ac.jp

1P-009

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

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

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

【実験】試料は、エメリー紙#1200 で研磨した Ti 基板を第三リン酸カルシウム粉末(CP：$3Ca_3(PO4)_2$・$Ca(OH)_2$)と 0.1~3 M 硝酸ストロンチウム($Sr(NO_3)_2$)溶液で調整したスラリーに埋没し、大気雰囲気下 650℃で 2 h 保持することで作製した。試料表面の化学組成及び Sr 含有量は、線光電子分光法(XPS)及び蛍光 X 線分析(XRF)でそれぞれ評価した。また試料からの Sr 溶出量は、試料を 37 ℃に保持したリン酸緩衝液(PBS)中で 24 時間振とう浸漬した後、PBS 中の Sr 濃度を黒鉛炉原子吸光光度法(GF-AAS)で定量分析することで評価した。さらに、試料の骨形成性能は、オートクレーブ滅菌後の試料表面にヒト骨芽細胞様細胞 Saos-2 を播種し、一定期間培養後石灰化により沈着したカルシウムを定量することで評価した。

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

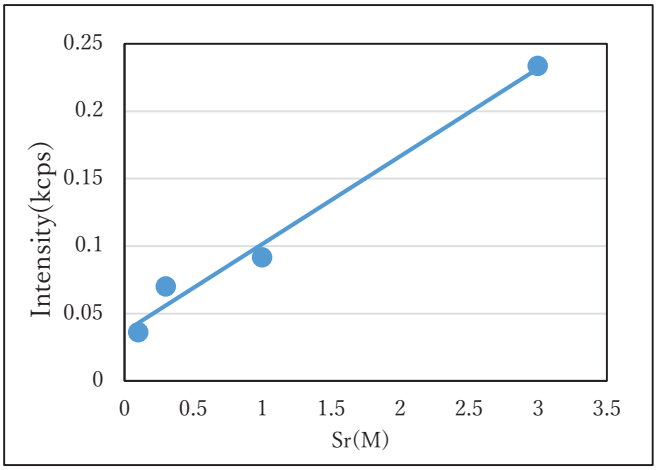


図 1:各試料表面における XRF スペクトルのピーク強度

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

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

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

1P-010

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

[1] 明治大学, [2] グンゼ株式会社
○島川 楓[1], 永田幸平[1], 木南啓司[2], 中野和明[1], 長屋昌樹[1], 長嶋比呂志[1], 相澤 守[1]

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

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

生体吸収率（%）=［欠損部面積（mm^2）- セメント残存面積（mm^2)］/［欠損部面積（mm^2)］×100

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

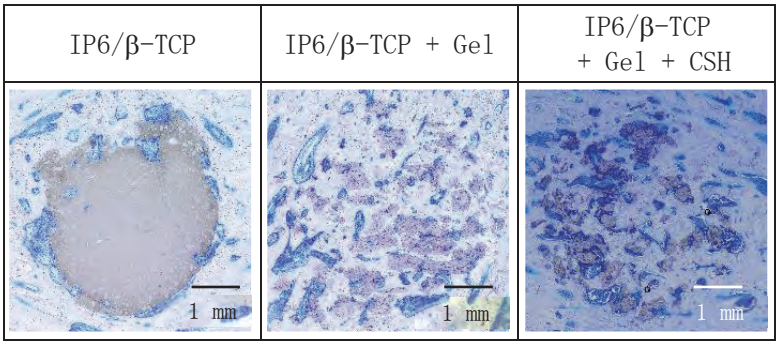


Fig. 1 Comparison of living reaction among three kinds of IP6/β-TCP cements (TB stain).

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

[1] T. Konishi *et al.*, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **24**, 1384-1394 (2013).
[2] K. Kiminami *et al.*, *J. Ceram. Soc. Japan*, **126**, 71-78 (2018).

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

Kaede Shimakawa[1], Kohei Nagata[1], Keishi Kiminami[2], Kazuaki Nakano[1], Masaki Nagaya[1], Hiroshi Nagashima[1], Mamoru Aizawa[1]
[1]Meiji University, [2]GUNZE LIMITED
Tel: +81-44-934-7237, Fax: +81-44-934-7906, E-mail: mamorua@meiji.ac.jp

1P-011

Zr−1Mo 合金表面における細胞の増殖性および接着性の影響

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

【緒言】
磁気共鳴画像(MRI)検査において、体内に金属材料を埋入されていると、金属デバイスが磁化され MR 画像に欠損や歪み（アーチファクト）が生じ、診断を妨げてしまうことがある。アーチファクトを軽減するためには金属材料の低磁化率化が必要であり、当研究室では低磁化率かつ機械的性質が良好な Zr-1mass%Mo 合金を開発している。しかし、Zr-1Mo 合金を医療材料として用いるために最も重要である生体安全性については詳細に評価していない。そこで本研究では、繊維芽細胞様細胞および骨芽細胞様細胞を用いた細胞増殖試験を行い、すでに体内埋入部材に使用されている金属試料と比較することにより Zr-1Mo 合金の細胞適合性を評価した。
【実験】
熱間鍛造 Zr-1Mo 合金およびコントロール試料（CP Ti、 Ti-6Al-4V ELI 合金、 SUS316L ステンレス鋼）の各直径 8 mm 丸棒材を切り出し、SiC 耐水研磨紙を用いて湿式研磨をし、各試料の表面粗さ Sa を揃えた。70%エタノールで各試料を滅菌した後に、4 種類の細胞株（L929、 NIH/3T3、MC3T3-E1、MG-63）を用いて、5 日間の細胞増殖評価を行った。Cell counting kit-8（cck-8, Dojindo）を用いて試料表面での生細胞数を測定した。また、10%中性緩衝ホルマリン溶液により細胞の固定を行い、乾燥後に走査型電子顕微鏡（SEM）により各試料表面を観察した。
【結果と考察】
表面粗さ Sa を揃えた各試料表面に 4 種類の細胞株を用いた増殖試験結果から、Zr-1Mo 合金とコントロール試料との間で細胞数に有意差はみられなかった。このことから、線維芽細胞様細胞および骨芽細胞様細胞において、Zr-1Mo 合金は CP Ti, Ti-6Al-4V ELI 合金、 SUS316L 鋼と同様に細胞毒性が低いことが明らかとなった。例として、L929 細胞での細胞増殖試験結果を図 1 に示す。また、L929 細胞において、SEM 観察（図 2）により、Zr-1Mo 合金上での細胞形態は CP Ti や Ti-6Al-4V ELI 合金と同様な伸長形態（elongated morphology）であり、また SUS316L 鋼は拡張形態（extended morphology）であることが確認できた。

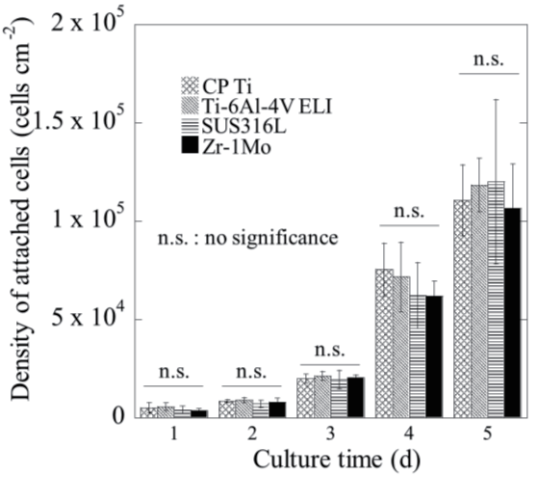


図 1. L929 細胞増殖試験結果

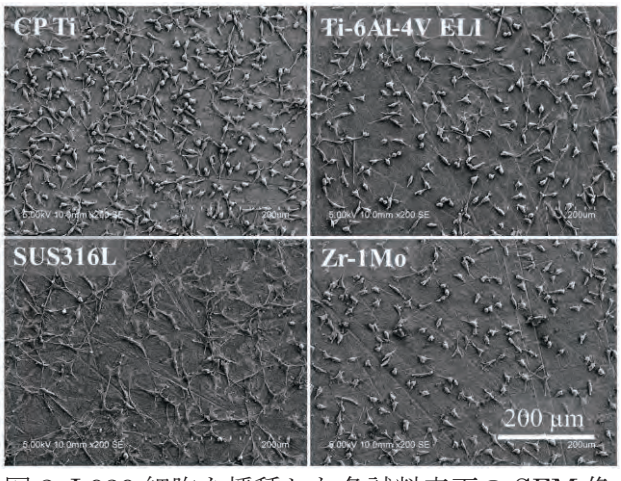


図 2. L929 細胞を播種した各試料表面の SEM 像

Effects of Zr-1Mo alloy on cell attachment and proliferation of four mammalian cell types
Naoki OZAWA[1], Peng CHEN[2], Maki ASHIDA [2], Hisashi DOI [2], Yusuke TSUTSUMI [2], Takao HANAWA [2]
[1]Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University [2]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8011, Fax: +81-3-5280-8011, E-mail: ma170031@tmd.ac.jp

1P-012

ミネラル周囲の水和構造と硬組織形成への影響

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

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

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

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

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

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

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

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

Water structuring on minerals and its role in bone tissue formation

Masahiro Okada[1], Emilio Hara[1], Masaru Tanaka[2], Takuya Matsumoto[1]
[1]Department of Biomaterials, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University
[2]Soft Materials Chemistry, Institute of Material Chemistry and Engineering, Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University
Tel/Fax: +81- 86-235-6666, E-mail: m_okada@cc.okayama-u.ac.jp

1P-013

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

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

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

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

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

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

Kazuma TAKASHIMA[1], Ichiro NAKAHARA[2], Shunichi BANDOU [3], Kazunori TAMURA[1], Ryota NAKAYA[4], Hidetoshi HAMADA[5], Wataru ANDO[1], Masaki TAKAO[5], Nobuhiko SUGANO[1]
[1]Department of Orthopedic Medical Engineering, Osaka University Graduate School of Medicine
[2]Department of Orthopedic Surgery, National Hospital Organization Osaka National Hospital
[3]B.I.TEC Co., Ltd.
[4]Department of Orthopedic Surgery, Amagasaki Chuo Hospital
[5]Department of Orthopedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine
Tel: +81-6-6879-3271, Fax: +81-6-6879-3272, E-mail: t.kazuma@hotmail.co.jp

1P-014

QCM 法による義歯床用金属材料への唾液糖タンパクの吸着解析

鶴見大学歯学部歯科理工学講座
○廣田正嗣，吉田英史，早川　徹

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

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

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

Table 1 BSA，MCN の吸着量(ng/mm²)

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

( )：標準偏差，同一文字有意差なし(p>0.05)

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

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

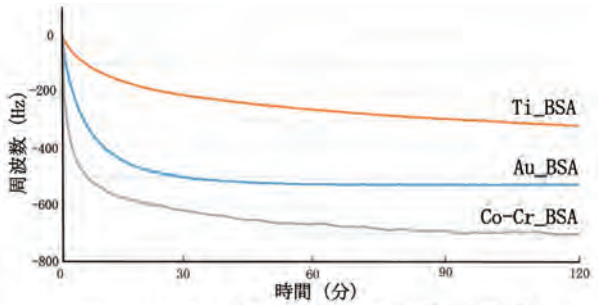


Figure 1 アルブミン吸着による振動数減衰曲線

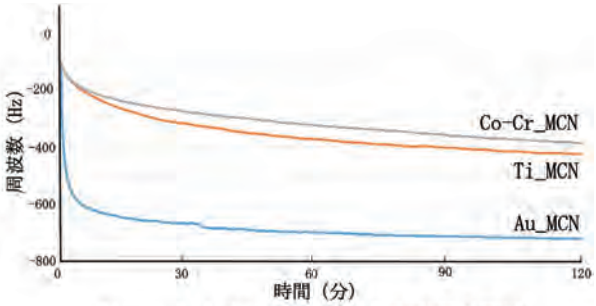


Figure 2 ムチン吸着による振動数減衰曲線

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

Masatsugu Hirota[1], Eiji Yoshida[1], Tohru Hayakawa[1]
[1]Department of Dental Engineering, Tsurumi University School of Dental Medicine
Tel: +81-45-580-8369, Fax: +81-45-573-9599, E-mail: hirota-masatsugu@tsurumi-u.ac.jp

1P-015

新規超弾性形状記憶合金 Ti-Mo-Sn-Zr の耐食性評価

[1] 東北大学大学院歯学研究科，[2] 東北大学大学院医工学研究科
○布目　祥子[1]，王　鋭[1, 2]，横田　琴音[1]，古谷　真衣子[1]，金髙　弘恭[1, 2]，五十嵐　薫[1]

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

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

【結果と考察】
アノード分極試験において人工唾液中では２種の金属試料の分極曲線は類似していた。一方、900ppm フッ化物洗口液中では TMSZ の方が Ni-Ti と比較し耐食性がやや高い傾向が認められた。また、表面構造分析の結果、SEM において、Ni-Ti においては孔食像が認められたのに対し、TMSZ について 900ppm フッ化物洗口液において明らかな腐食像は認められなかった。
以上の結果より、超弾性を示す、ニッケルフリー新規形状記憶合金である TMSZ 合金は Ni-Ti と比較し、同等以上の耐食性を有することが示唆された。

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

Shoko NUNOME[1], Rui WANG[1, 2], Kotone YOKOTA[1], Maiko FURUYA[1], Hiroyasu KANETAKA[1, 2], and Kaoru IGARASHI[1]
[1]Tohoku University Graduate School of Dentistry
[2]Tohoku University Graduate School of Biomaterial Engineering
Tel: +81-22-717-8419　Fax: +81-22-717-8419 E-mail:shoko.nunome.b6@tohoku.ac.jp

1P-016

傾斜機能型ナノハイブリッドチタンが歯髄幹細胞に及ぼす影響

愛知学院大学歯学部有床義歯学講座
○青柳　敦士，秦　正樹，松川　良平，今西　悠華，小島　規永，尾澤　昌悟，武部　純

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

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

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

①歯髄幹細胞の同定

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

②チタン上の DPSCs の反応

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

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

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

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

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

Atsushi Aoyagi, Masaki Hata, Ryouhei Matsukawa , Yuka Imanishi, Norinaga Kojima, Shogo Ozawa, Jun Takebe
Department of Removable Prosthodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
Tel: +81-52-759-2152, Fax: +81-52-759-2152, E-mail: atsushi3701@gmail.com

1P-017

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

[1] 大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座
○Yuanyuan Yang[1], Zhang Honghao[1], 小正　聡[1], 吉峰茂樹[1], 岡崎定司[1]

【緒言】Previously, we demonstrated that strong alkali treatment of titanium generates a basic, hydrophilic sodium titanate layer with nanonetwork structure. These materials exhibit enhanced osteogenic activity *in vitro* and *in vivo*, are fabricated in controllable conditions without heating and hence consume minimal energy, are environmentally friendly, and less expensive. However, these materials are susceptible to bacterial attachment and biofilm formation, which may easily result in infection post-implantation or in long-term peri-implantitis[20]. In this study, titanium with nanonetwork structure (TNS) was further modified with Ag nanoparticles by immersing in $AgNO_3$, followed by ultraviolet chemical reduction to enhance its antibacterial activity. In addition, the material was coated with NAC through layer-by-layer assembly method to reduce intracellular ROS levels and further enhance the antibacterial effect. We anticipate that our results will provide a rationale for applying NAC and Ag on orthopedic and dental implants.

【実験】To generate surface nanonetwork structures, titanium discs were immersed in 10 M NaOH at 30°C for 24 h, rinsed several times with ion-exchanged water until the conductivity of the solution dropped below 5 μS/cm[3]. Subsequently, some alkali-treated discs were immersed in 0.1 M $AgNO_3$ at 40°C for 3 h, lightly washed in deionized water, air-dried, irradiated for 15 min at $\lambda = 254$ nm and 100 mW/cm^2, and ultrasonically washed in ion-exchanged water for 1 min. For coating, Ag-doped discs were immersed in 2 mM and 5 mM NAC and air-dried on a clean bench in several cycles until appropriate amounts of NAC were deposited. All titanium discs were divided into the following four groups: TNS (titanium with nanonetwork structure), TNS-Ag (Ag-doped titanium with nanonetwork structures), Ag-NAC-2 (Ag-doped titanium with nanonetwork structures coated with 2 mM NAC) and Ag-NAC-5 (Ag-doped titanium with nanonetwork structures coated with 5mM NAC). Surface characteristics (SEM, XPS and contact angle), bacterial experiments *(S. aureus* (ATCC 12600) and *A.oris* (MG-1)), and cell experiments (Cell viability) were each conducted in triplicate. All quantitative results were expressed as means ± standard deviations. Results were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post hoc test using SPSS 20.0 software (IBM Co., Armonk, NY, USA); $p < 0.05$ was considered statistically significant.

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

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

Yuanyuan Yang[1], Zhang Honghao[1], Satoshi Komasa[1], Shigeki Yoshimine[1], Joji Okazaki[1]
1Department of Removable Prosthodontics and Occlusion, Osaka Dental University
Tel: +81-90-3924-0801, Fax: +81-72-864-3176, E-mail: yang-y@cc.osaka-dent.ac.jp

1P-018

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

[1] 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎口腔外科学分野, [2] 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻生体機能高分子学分野
○木下 直哉[1,2], 佐々木 善浩[2], 河崎 陸[2], 丸川 恵理子[1], 原田 浩之[1], 秋吉 一成[2]

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

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

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

[1] R. Kawasaki; Y. Sasaki; K. Katagiri; S. Mukai; S. Sawada; K. Akiyoshi. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 11377-11381 (2016)
[2]K. Katagiri; K. Ohta; K. Inumaru; K. Hayashi; Y. Sasaki; K. Akiyoshi. *ChemPlusChem*. **79**, 1631-1637 (2014)

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

Naoya KINOSHITA[1,2], Yoshihiro SASAKI[2], Riku KAWASAKI[2], Eriko MARUKAWA[1], Hiroyuki HARADA[1], Kazunari AKIYOSHI[2]
[1]Department of Oral Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University
[2]Department of polymer chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

1P-019

酸化グラフェンスキャフォールドへの亜鉛担持による抗菌性の向上

[1] 北海道大学大学院歯学研究院 歯周・歯内療法学教室
[2] 株式会社日本触媒
○西田 絵利香[1]，宮治 裕史[1]，蔀 佳奈子[1]，菅谷 勉[1]，小野 博信[2]

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

【実験】
GO（0.01%，日本触媒）の N-メチル-2-ピロリドン（NMP）分散液に，酢酸亜鉛（0.001～1%）を添加して， GO/Zn 分散液とした．コラーゲンスキャフォールド（6×6×3mm，テルダーミス，オリンパステルモバイオマテリアル）を GO/Zn 分散液，あるいは GO 分散液，酢酸亜鉛溶液のみに浸漬後，エタノール系列にて洗浄，乾燥させて GO/Zn，GO，Zn スキャフォールドとした．
まず，各スキャフォールドの XRF 及び XRD 測定を行った．次に口腔内細菌である *Streptococcus mutans*（ATCC35668）と *Actinomyces naeslundii*（ATCC27039）を用いて細菌培養試験を行った．スキャフォールドに各菌懸濁液（6.0×10^{6} CFU/mL）を播種，嫌気下にて培養後，5 時間後に LIVE/DEAD 染色を行った．また，24 時間培養後に培地の濁度測定を行った．次に，骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞（1×10^{4}cell）をスキャフォールドに播種培養し，細胞増殖量の計測と LIVE/DEAD 染色を行った．

【結果と考察】
XRF 測定の結果，酢酸亜鉛の添加濃度に依存してスキャフォールドへの Zn 担持量が増大した．Zn 担持量は GO の有無に関連を認めなかった．また，XRD 測定の結果，GO/Zn あるいは Zn スキャフォールドからは $Na_6(ZnPO_4)_6(H_2O)_8$ のピークが同定された．
濁度測定試験の結果，GO/Zn スキャフォールドは強い濁度増加抑制を示した．GO/Zn スキャフォールドの抑制効果は両菌種に対して発現した．酢酸亜鉛濃度の違いによる濁度の差は見られなかった．LIVE/DEAD 染色では，酢酸亜鉛濃度が 0.01%以上で多くの死菌をスキャフォールドに認めた．
細胞培養試験では酢酸亜鉛を添加しても細胞増殖性に差を認めなかった．LIVE/DEAD 染色でも死細胞の増加は認めなかった．
以上より，Zn を担持した GO スキャフォールドは優れた抗菌性を示すとともに，細胞親和性が良好であることが示唆された．

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

Erika Nishida[1], Hirofumi Miyaji[1], Kanako Shitomi[1], Tsutomu Sugaya[1], Hironobu Ono[2]
[1]Department of Periodontology and Endodontology, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University
[2]NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.
Tel: +81-11-706-4266, Fax: +81-11-406-4334, E-mail: erikanishida@den.hokudai.ac.jp

1P-020

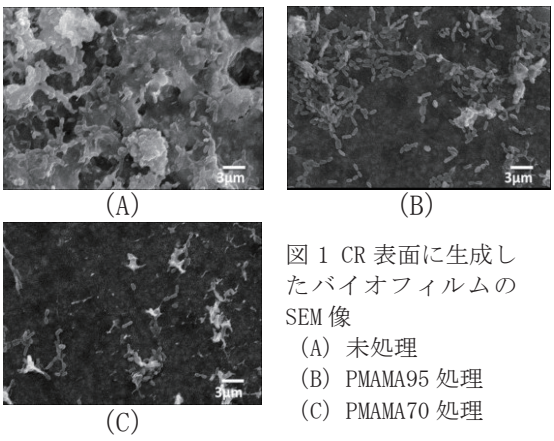
歯科用コンポジットレジンの MPC ポリマーによる *in situ* 細菌感染予防とその物理的耐久性

[1] 自治医科大学歯科口腔外科学講座, [2] 東京大学大学院工学系研究科
○小山　潤[1,2]，深澤　今日子[2]，井上　祐貴[2]，石原　一彦[2]，森　良之[1]

【緒言】現在、う蝕治療の歯科用修復物としてコンポジットレジン(CR)が広く使用されている。しかしながら、CR の表面に *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)などのう蝕原因菌が付着することによって二次う蝕が起こることが問題となっている。う蝕原因菌はタンパク質の吸着層が主となるデンタルプラークの中に存在するため、二次う蝕を抑制するためには CR 表面へのタンパク質吸着層の形成を抑制することが必須である。そこで、タンパク質や細胞、細菌の付着を抑制する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)ポリマーに着目した。本研究では、MPC ポリマーにより口腔内で CR 表面を処理し、タンパク質吸着層形成および細菌付着を抑制することを目的とする。口腔内で処理するためには、歯肉、頬粘膜、舌等の口腔内軟組織に侵襲を与えないような溶媒の選択や反応条件が必要となる。そこで、歯科治療で通常用いられている光反応を用いて CR 表面に MPC ポリマーを結合させることにした。具体的には、側鎖に重合性基（CH_2=C）を有する MPC ポリマー(PMAMA：poly[MPC-*co*-2-aminoethyl methacrylate (AEMA) -*co*-*N*-methacryloylethyl methacrylamide (MAEMA)])溶液を CR 表面に塗布し、光照射することで、CR 表面の未反応の重合性基（CH_2=C）と MPC ポリマーを化学結合させた。表面処理後の CR 基板の表面特性およびタンパク質吸着、細菌付着、バイオフィルム形成挙動の評価を行った。また、我々は毎日のように歯ブラシによるブラッシングを行う。CR 表面に化学結合した MPC ポリマーの物理的耐久性の評価を行うために歯ブラシによる摩擦試験を行い、その後の CR 基板の表面特性について評価を行った。

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

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



(A)　(B)
(C)

図 1 CR 表面に生成したバイオフィルムの SEM 像
(A) 未処理
(B) PMAMA95 処理
(C) PMAMA70 処理

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

Jun Koyama[1,2], Kyoko Fukazawa[2], Yuuki Inoue[2], Kazuhiko Ishihara[2], Yoshiyuki Mori[1]
[1]Department of Dentistry, Oral and Maxillofacial Surgery, Jichi Medical University
[2]Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo
Tel: +81-285-58-7390, Fax: +81-285-44-8669, E-mail: koyama@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

1P-021

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

[1]徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔外科学分野, [2]福岡歯科大学生体工学分野,[3]九州大学歯学研究院生体材料学分野
○ 秋田 和也[1], 福田 直志[1], 大江 剛[1], 真野 隆充[1], 都留 寛治[2], 石川 邦夫[3], 宮本 洋二[1]

【緒言】われわれは生体内で吸収されて骨置換する炭酸アパタイト(CO_3Ap)顆粒を開発し、新規骨補填材料として 2017 年に薬事承認を得た。本品は 2018 年より市販されているが、この顆粒は緻密体であるため、さらなる迅速な骨置換を目指し、現在改良を行っている。今回マイクロファイバーを混入した石膏を前駆体とし、溶解−析出反応により組成変換を行うことで、種々の気孔径を有する多孔質 CO_3Ap 顆粒を作製し、その物理学的特性を検討した。さらにウサギ頭蓋骨へ埋入し組織学的検討を行ったので、併せて報告する。

【実験】半水石膏とマイクロファイバー(ファイバー径;50、120、205 μm)を, マイクロファイバーの重量比が 10 wt% となるように混合し、混水比 0.2 で練和後、冷間等方圧加圧法により 50 MPa の圧力下で硬化させた。硬化後、700℃(昇温速度 0.13℃/分)で 5 時間焼成することによってファイバーを除去し、これを前駆体とした。その後、顆粒径が 1.0 ～ 1.4 mm となるように粉砕、分粒し、炭酸ナトリウム水溶液およびリン酸水素ナトリウム水溶液に浸漬し、CO_3Ap へ組成変換を行った。変換前後における形態学的観察は走査型電子顕微鏡を用いて行い、組成分析に関しては X 線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いて行った。次いで、日本白色ウサギ頭蓋骨に φ8 mm の骨欠損を作製し、緻密体 CO_3Ap 顆粒、気孔径:50、120、205 μm の多孔質 CO_3Ap 顆粒を埋入した。埋入後 2、4、8 週経過後に摘出し、研磨標本を作製して、骨欠損部の骨新生について組織学的評価を行った。

【結果と考察】前駆体である硫酸カルシウムは炭酸ナトリウム水溶液に 7 日間浸漬することで炭酸カルシウムに組成変換し、これをリン酸水素ナトリウム水溶液に 14 日間浸漬することで CO_3Ap へ組成変換した。気孔径の違いによる変換速度に差は認めなかった。また、CO_3Ap へ変換後も前駆体で形成した気孔径は維持されていた。研磨標本による観察では、多孔質 CO_3Ap 顆粒は緻密体同様優れた骨伝導性を示し、埋入後 2 週で気孔内部にも新生骨を認めた。なお、気孔内部における新生骨量は、気孔径 120 μm の多孔質 CO_3Ap 顆粒群で多い傾向にあった。以上の結果より、ファイバー含有石膏を焼成し、これを前駆体として組成変換を行うことにより、種々の気孔径を有する多孔質 CO_3Ap 顆粒の調整に成功し、さらに気孔内部における骨新生も確認した。以上より, 多孔質 CO_3Ap 顆粒による迅速な骨置換の可能性が示唆された.

Fabrication of porous CO_3Ap granules using micro fiber and application for bone reconstruction

Akita KAZUYA[1], Fukuda NAOYUKI[1], Ohe GO[1], Mano TAKAMITSU[1], Tsuru KANJI[2], Ishikawa KUNIO[3] and Miyamoto YOUJI[1]
[1]Department of Oral Surgery, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, [2]Section of Bioengineering, Fukuoka Dental College, [3]Department of Biomaterials, Faculty of Dental science, Kyushu University
Tel: +81-88-633-7354, Fax: +81-88-633-7462, E-mail: c301551016@tokushima-u.ac.jp

1P-022

PLA ケージで被覆した OCP/Col の垂直的骨増生

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

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

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

【結果と考察】
マイクロ CT 撮影の結果，N 群，B 群，S 群ともに既存骨側および PLA ケージ内縁において放射線不透過性が時間経過とともに亢進していた。また，B 群と S 群では，それぞれ PLA ケージに形成されている孔周辺に透過像が多かった。組織学的観察の結果，N 群，B 群，S 群ともに既存骨側と PLA ケージ内縁において新生骨形成量が多かった。また，B 群と S 群では，骨膜側における PLA ケージの孔から線維組織が侵入したため，孔周辺の新生骨形成量が少なかった。その他，骨膜周辺には新生骨は形成されていなかった。組織定量学的解析の結果，再生骨率は，S 群，N 群，B 群の順で高く，各領域での再生骨率はいずれも LM，UM，LC，UC の順で高かった。また，B 群と S 群では，PLLA ケージに形成された孔がある領域において，孔が形成されていない N 群では生じなかった有意差が生じた。
以上の結果より，PLA ケージで被覆した OCP/Col の骨増生は骨膜側の細胞接触の有無に関わらず，既存骨側を起点に起こること，PLA ケージ内縁に形成されること，またより確実な骨増生には広範な骨膜側の細胞接触が必ずしも有効に作用しない可能性が示唆された。

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

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

1P-023

免疫原性細胞死を活用するためのがん光熱免疫療法用アジュバント

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

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

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

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

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

Adjuvant for cancer photothermal-immunotherapy to utilize immunogenic cell death

Kaoru Hashimoto[1], Xiupeng Wang[2], Mayu Yasunaga[2], Atsushi Yamazaki[1], Atsuo Ito[2]
[1]Faculty of Science and engineering, Waseda University [2]Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST)
E-mail: s-f.welkin@fuji.waseda.jp

1P-024

免疫賦活剤担持水酸アパタイトセラミックスの作製と免疫細胞応答性

[1] 明治大学大学院理工学研究科応用化学専攻
[2] 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子免疫学分野
○加々見　早苗[1]，木造　理萌子[1]，永井　重徳[2]，相澤　守[1]

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

【実験】
HAp-100 粉体（太平化学）～0.01 g に対し、免疫賦活剤溶液 1.5 cm^3 を加え、マイクロチューブ内で 25 ℃, 48 h 振とうすることで免疫賦活剤を担持した。その後、各免疫賦活剤担持 HAp 粉体 ～0.01 g を 0.5 cm^3 のリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）(pH 7.4) および酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）に浸漬し、37 ℃, 7 日間振とうすることで免疫賦活剤の徐放特性を調査した。
次いで、免疫賦活剤を担持した HAp セラミックスへのマウス脾臓細胞応答性を調査した。HAp-100 粉体 ～1.0 g を 50 MPa で一軸加圧成形し、1200 ℃, 5 h 焼成することにより HAp セラミックス（直径 ～15 mm, 厚さ ～2.0 mm）を作製した。その後、鏡面研磨と乾熱滅菌を行ない、得られた HAp セラミックスを濃度 1500 ppm の Con A 溶液に 48 h、5 ppm の抗 CD3 抗体溶液に 24 h 浸漬させることで免疫賦活剤担持 HAp セラミックスを得た。同様の条件で細胞培養用ポリスチレンプレートにも各免疫賦活剤を担持させ、これらを比較することで HAp の有用性を調査した。担持後、C57BL/6N マウス由来脾臓細胞を播種し、培養 1 日後、フローサイトメーターを用いて活性化免疫細胞（CD69 陽性細胞）の割合を算出した。さらに、培養 1, 3 日後には細胞数のカウントと走査型電子顕微鏡（SEM）による形態観察も行なった。

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

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

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

Sanae Kagami[1], Rihoko Kizukuri[1], Shigenori Nagai[2], Mamoru Aizawa[1]
[1]Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University
[2]Department of Molecular Immunology, Graduate School of Medical and Dental Sciences
Tel: +81-44-934-7237, Fax: +81-44-934-7906, E-mail: mamorua@meiji.ac.jp

1P-025

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

[1] 関西大 ORDIST，[2] 関西大化学生命工，[3] 関西大医工薬連携研究センター
○能﨑優太 [1]，葛谷明紀 [2,3]，大矢裕一 [2,3]

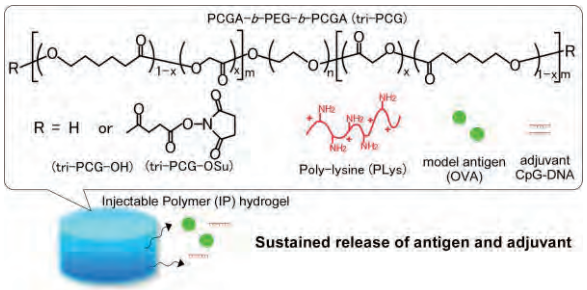


Fig. 1. Design of sustained releasing system for antigen and adjuvant using IP hydrogel exhibiting irreversible gelation.

【緒言】
免疫系を人為的に制御することにより，感染症予防やがん治療を達成する試みが行われている。免疫を制御するための薬剤はワクチンと呼ばれ，抗原と免疫を賦活する物質(アジュバント)から構成される。ワクチンによる免疫獲得の効率化のため，抗原の標的細胞への送達，抗原の持続的な供給(徐放)や投与の簡便性向上といった特性が求められており，ヒドロゲルなどのマトリックスからの徐放が一つの解決手段であると考えられる。一方，生体内に注入すると *in situ* でヒドロゲルを形成するインジェクタブルポリマー（IP）は，薬や細胞などを溶解・懸濁することができるため，ドラッグデリバリーシステムや組織再生用足場材料への応用が期待されている。我々はこれまでに，生分解性 IP として，カプロラクトン-グリコール酸共重合体 (PCGA) とポリエチレングリコール (PEG) から成るトリブロック共重合体 (PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA) (tri-PCG)を基盤として，それらの医療応用について報告してきた [1]。特に近年では，体温に応答して物理架橋を形成したのちに化学架橋ゲルへと移行し，体内で長期間ゲル状態を維持できる IP システムを報告している。tri-PCG の末端にスクシンイミド(OSu)基を導入した tri-PCG-OSu と tri-PCG の混合ミセル水溶液に水溶性ポリアミンであるポリリシン(PLys)を混合することで，温度に応答してゲル化する際に，OSu 基とアミノ基が反応してアミド結合を形成し，化学架橋を持つヒドロゲルを調製できることを明らかにした [2]。本研究では，不可逆的なゲル化を示す IP システムを用いて抗原とアジュバントを徐放可能な IP システムの開発を目的とした。モデル抗原として卵白由来オボアルブミン(OVA)を使用し，アジュバントとしては，免疫担当細胞の Toll-like 受容体 9 を刺激することが知られているオリゴヌクレオチド，CpG-DNA を用いた。

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

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

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

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

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

1P-026

BNCT への応用を目指したボロン酸結合ポリマーミセルの調製

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

【緒言】近年，身体への負担の少ないがん治療法としてホウ素中性子補足療法 (BNCT) が注目されている [1]。BNCT とはホウ素化合物を腫瘍細胞に選択的に取り込ませ，体外から低エネルギーの熱中性子線を照射し，その際に生じるホウ素と熱中性子との核分裂 (α 線と ^{7}Li 粒子の放出) を利用して腫瘍細胞を選択的に破壊する放射線療法の一種である。従来の放射線 (X 線) 療法では，正常細胞にも影響を与えてしまうが，BNCT で放出される α 線と ^{7}Li 粒子は短い距離で消滅し，細胞一個分程度にしか影響を与えず，選択的にホウ素化合物を集積できさえすれば，腫瘍細胞のみを死滅させることが可能であると考えられている。現在，BNCT 用のホウ素薬剤として，フェニルアラニンのパラ位にボロン酸が結合した *p*-boronophenylalanine (BPA) を用いた治験が行われている。BPA はアミノ酸代謝が亢進している腫瘍細胞に比較的取り込まれやすいという特徴を持っているが，体外排泄が早いため，有効濃度の BPA を腫瘍細胞に送達させるためには大量投与が必要であり，腫瘍集積性を高めるためのドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が望まれている。本研究では，ナノ粒子が EPR (Enhanced Permeation and Retention) 効果などにより腫瘍に集積する可能性が高まることに着目し，多数のホウ素原子を含むナノ粒子を調製し，BNCT に利用することを考えた。フェニルボロン酸 (PBA) と 1,2-ジオールはボロン酸エステルを形成することが知られている。そこで，1,2-ジオール基を持つモノマーとして *N*-2,3-ジヒドロキシプロピルアクリルアミド (DHPA) を設計し，これと血中滞留性の向上を意図してポリエチレングリコール (PEG) を導入したジブロック共重合体 PDHPA-*b*-PEG を設計・合成した。この共重合体の PDHPA 側鎖のジオールが PBA と結合すると疎水性となり，両親媒性構造をとるため，水溶液中で PBA との結合により高分子ミセルを形成すると期待される(Fig. 1)。

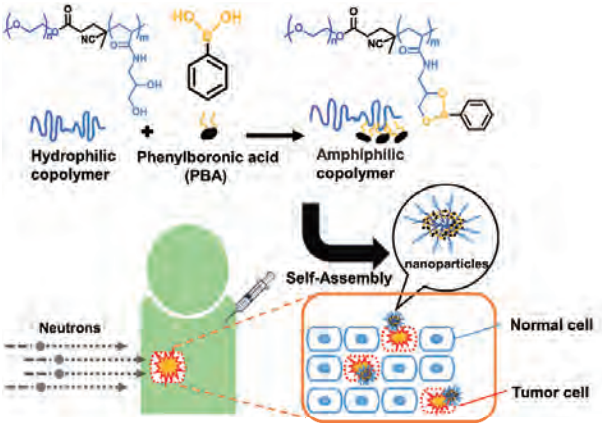


Figure 1. Schematic illustration for BNCT using boronic acid-binding block polymer micelle.

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

【参考文献】

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

Preparation of boronic acid binding polymer micelles for BNCT.

Ryoya UMEYAMA[1], Yuta YOSHIZAKI[2], Shin-ichi MIYATAKE[4] Akinori KUZUYA[1,2,3], Yuichi OHYA[1,2,3]
([1]Faculty of Chem. Mater. & Bioeng, Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ., [3]CEMP, Kansai Univ., [4]Osaka Medical College. 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan)
[1]Tel: +06-6368-0818, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

1P-027

細胞膜破壊能を有するアニオン性ジブロック共重合体からなる高分子ミセルの機能

東理大院基礎工[1]・ Univ. Wisconsin[2]
○後藤健[1]・小松周平[1]・石原量[1]・Glen S. Kwon[2]・菊池明彦[1]

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

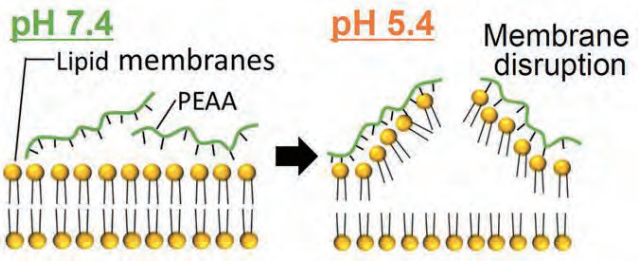


Fig. 1 Mechanisms for membrane disruption by PEAA.

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

【結果と考察】合成した PEG-*b*-PEA の酸塩基滴定から，PEG-*b*-PEA の p*K*a は 6.3 であり，細胞外(pH7.4)から後期エンドソーム内(pH5.4)への pH 範囲内で pH 応答性を示すことを明らかにした。pH 7.4 と 5.4 の Rhodamine B 内包リポソーム水溶液に FITC ラベル化 PEG-*b*-PEAA を加えたところ pH 7.4 では PEG-*b*-PEAA の緑色蛍光が確認できなかったものの，pH 5.4 ではリポソームの赤色蛍光 (**Fig. 2b**)と PEG-*b*-PEAA の緑色蛍光 (**Fig. 2c**)が重なり，リポソーム表面に PEG-*b*-PEAA が吸着していることがわかった(**Fig. 2d**)。pH 変化にともなう PEG-*b*-PEAA と接触したリポソームの残存率の変化を観察したところ，pH 5.4 でのみリポソーム残存率が減少した。pH 7.4 においては，脱プロトン化した PEAA はリン脂質と相互作用しないのに対し，pH 5.4 で PEG-*b*-PEAA のカルボキシ基がプロトン化し，このカルボキシ基がリポソームのリン脂質膜と水素結合した結果[5]，膜破壊が生じたと考えられた。以上より， PEG-*b*-PEAA を用いて調製した PIC ミセルは，細胞外 pH から後期エンドソーム内 pH への変化に応じて崩壊し，膜破壊能による高効率な薬物輸送可能な DDS キャリアになり得ることが期待できる。

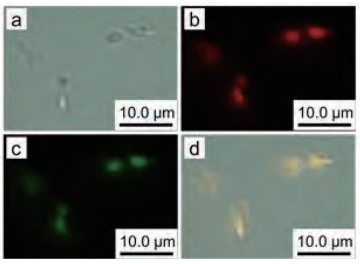


Fig. 2 Fluorescent images of liposomes containing Rhodamine B in pH 5.4. (PEG-*b*-PEAA conc. 1.0×10^{-3} wt% Exposure time 1/3 sec. a) Phase-contrast, b) Rhodamine B, c) FITC, d) merged.

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

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

Ken Gotoh[1], Syuuhei Komatsu[1], Ryo Ishihara[1], Glen S. Kwon[2], Akihiko Kikuchi[1]
([1]Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., 6-3-1 Niijuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan. [2]Sch. Pharm., Univ. of Wisconsin, USA) [1]Tel: +813-5876-1415, FAX: +813-5876-1639, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

1P-028

リガンド導入数制御を目指したγ-シクロデキストリン誘導体の分子設計

[1] 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻
○杉浦　幸作[1], 大谷　亨[1]

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

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

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



Fig. 1. Inclusion complexation between HPG-*g*-γCD and a dodecaborate

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

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

Kousaku Sugiura[1], Tooru Ooya[1]
[1] Department of Chemical Science and Engineering, Kobe University, Kobe, Japan
Tel: +81-78-803-6255, Fax: +81-78-803-6255, E-mail: ooya@tiger.kobe-u.ac.

1P-029

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

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

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

【実験】PEG/HA のリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)中での相分離条件を確認するため、異なる濃度の PEG 溶液と HA 溶液の混合溶液 500 μL を調製し、撹拌後、遠心分離を行い二相系の有無を確認した。二相形成が確認されなくなるまで上記の操作を繰り返し行い、相図を作成した。異なる分子量の PEG を用いて同様に相図を作成した。HA と片末端アミノ化 PEG(PEG-NH_2)を純水中で種々の濃度で混合し、縮合剤として DMT-MM を加え、PEG-*graft*-HA(Fig. 1)を得た。PEG-*graft*-HA の PEG 導入率を示差走査熱量（DSC）測定から算出した。得られた PEG-*graft*-HA を 12 mM PBS 溶液に溶解し(4wt %)、600 nm 波長光における透過率を測定からミクロ相分離状態を評価した。さらに、分子量の異なる PEG を用いて同様に PEG-*graft*-HA を調製した。

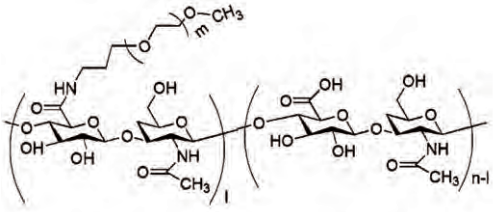


Fig.1 Chemical structure of PEG-*graft*-HA

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

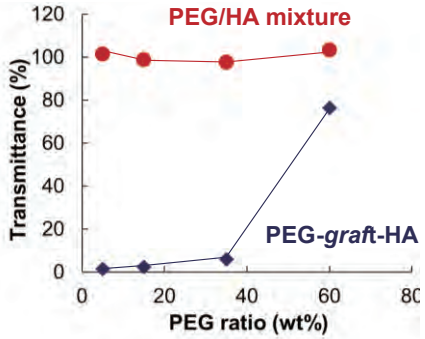


Fig.2 Transmittance change of PEG-*graft*-HA and PEG/HA mixture

【参考文献】

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

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

Kazune Oda[1], Ryo Adomi[1], Tooru Ooya[1]
[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

1P-030

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

東京農工大学大学院　工学府応用化学専攻
○西村　真之介，村上　義彦

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

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

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

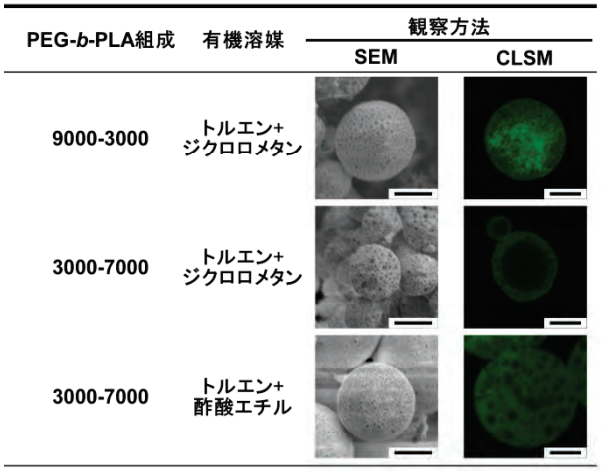


Fig. 1 PEG-*b*-PLAの組成および有機溶媒種が粒子の表面形態および内部構造に及ぼす影響（Bar: 5 μm）

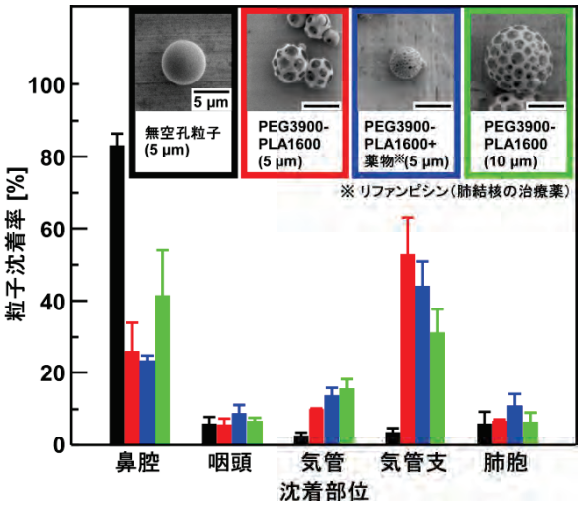


Fig. 2 呼吸器内における無空孔粒子および新奇多孔質粒子の沈着率

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

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

Shinnosuke NISHIMURA, Yoshihiko MURAKAMI (Development of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology)
Tel/Fax: +81- 42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

1P-031

細管による低侵襲な体内送達を可能とする多層構造型薬剤徐放シートの開発

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

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

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



図 1　シート型薬剤徐放デバイスの構造

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

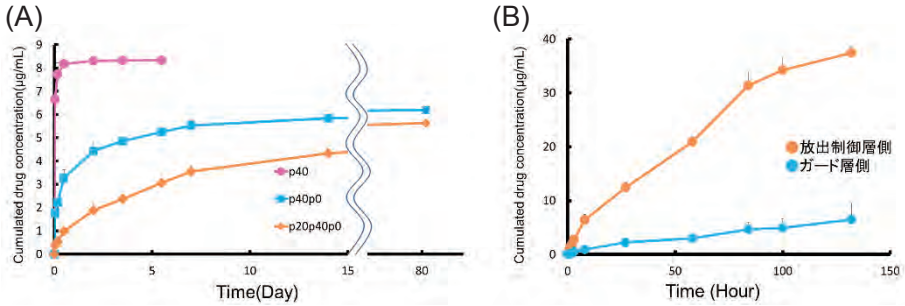


図 2 (A) 多層シートの薬剤徐放特性, (B) 片面徐放評価試験

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

Yuto Sato[1], Nobuhiro Nagai[2], Matsuhiko Nishizawa[1], Toshiaki Abe[2], Hirokazu Kaji[1]
[1]Department of Finemechanics, Graduate School of Engineering, Tohoku University
[2]Division of Clinical Cell Therapy, United Centers for Advanced Research and Translational Medicine (ART), Graduate School of Medicine, Tohoku University
Tel: +81-22-795-4249, E-mail: y.sato@biomems.mech.tohoku.ac.jp

1P-032

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

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

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

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

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

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

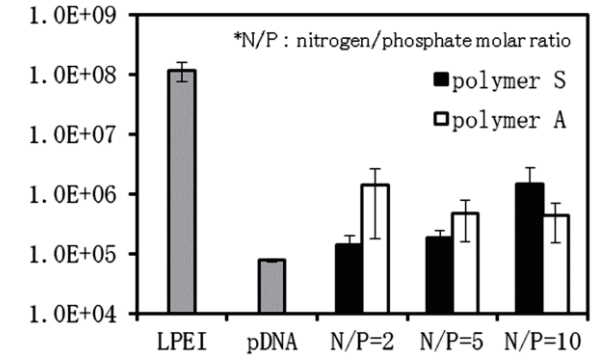


Fig.1 CT-26 を用いた遺伝子発現実験.

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

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

Ryusei Sugino [1], Tomohiro Shuno [1], Akihiro Kishimura [1,2,3], Takeshi Mori [1,2], Yoshiki Katayama [1,2,3,4]
[1]Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University, [2]The Center for Future Chemistry, Kyushu University, [3]International Research Center for Molecular Systems, Kyushu University, [4]The Center for Advanced Medical Innovation, Kyushu University
Tel: +81-092-802-2851, Fax: +81-092-802-2851, E-mail: 3sl17016r@sls.kyushu-u.ac.jp

1P-033

アシル化ポリロタキサンのナノ組織化挙動と疎水性薬物担体としての機能評価

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

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

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

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

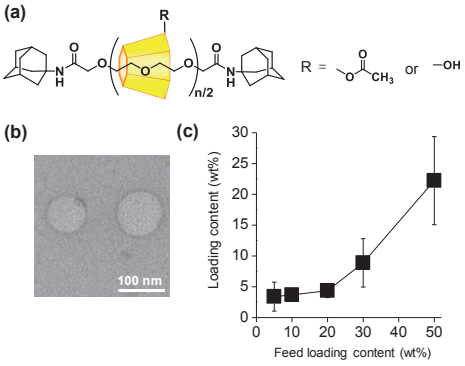


Figure 1. (a) Chemical structure of acetylated polyrotaxane (Ac-PRX). (b) TEM image of Ac-PRX (0.1 mg/mL). (c) Loading content of paclitaxel in Ac-PRX prepared at various feed loading content.

【参考文献】

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

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

Asato Tonegawa, Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui
Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
Tel: +81-3-5280-8022, Fax: +81-3-5280-8027, E-mail: yui.org@tmd.ac.jp

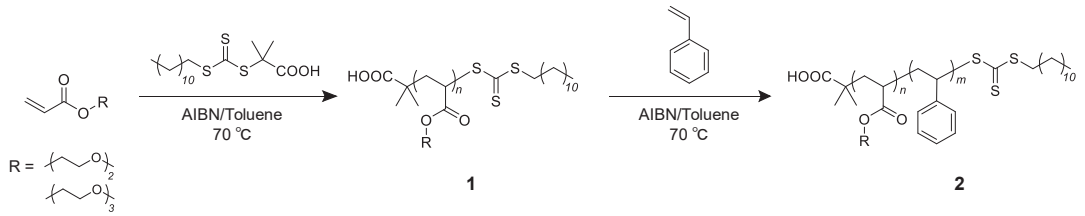
1P-034

高分子ミセルの細胞内取り込みに対する水和状態の影響

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

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

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



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

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

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

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

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

Hiroki Uehara[1], Shingo Kobayashi[2], Masaru Tanaka[1,2,3]
[1]Graduate School of Engineering, Kyushu University, [2]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, [3]Institute of Organic Materials, Yamagata University
Tel: +81-92-802-6238, Fax: +81-92-802-6238, E-mail: masaru_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

1P-035

親水性物質の内包を可能とするPEG修飾タンパク質中空ナノ粒子の開発

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

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

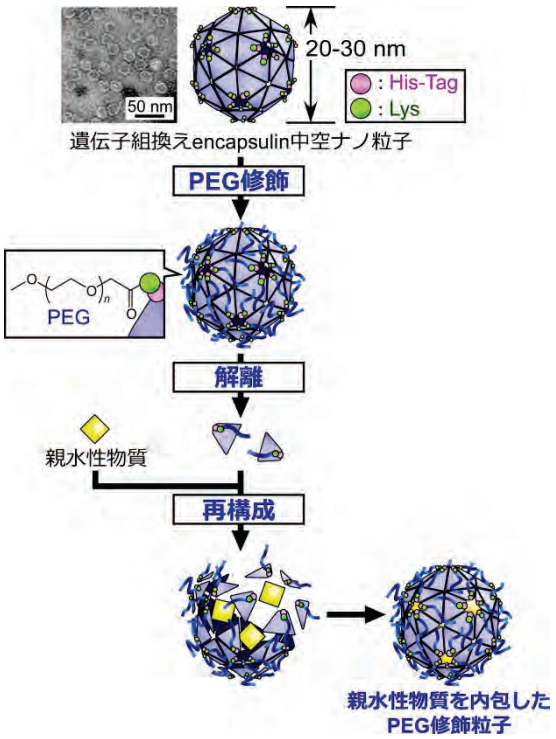


Fig. 1 薬物キャリアとしての PEG 修飾 encapsulin 中空ナノ粒子の応用

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

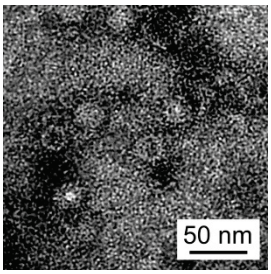


Fig. 2　β-Zeolite (Si/Al = 27) を用いて再構成した PEG 修飾粒子の TEM 画像

Development of hollow protein nanoparticles for possible incorporation of hydrophilic compounds

Seiichi Sonotaki[1], Keiichi Noguchi[2], Masahumi Yohda[2], Yoshihiko Murakami[1]
[1]Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology
[2] Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology
Fax:, E-mail: Tel: +81-42-388-7387, Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

1P-036

血中で病因物質を捕捉し，異所代謝経路へ誘導する ナビゲーター分子の機能評価

[1] 国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部
[2] 関西大学　化学生命工学部
○古屋敷　賢人[1,2]，神戸　裕介[1]，平野　義明[2]，山岡　哲二[1]

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

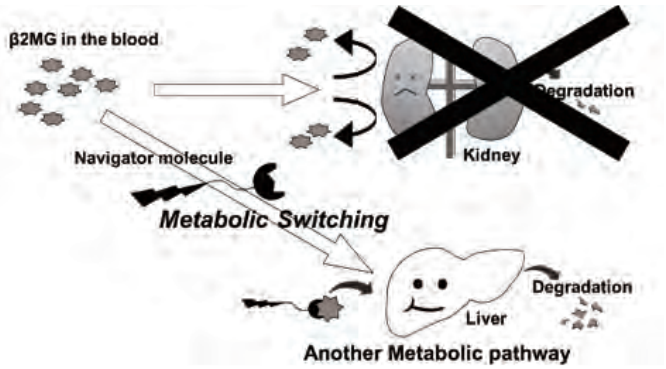


Fig. 1. Concept of DNCS. A navigator molecule captures β2MG and navigates it to the liver metabolic pathway.

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

アレクサフルオロ 750 で標識したナビゲーター分子（Alexa750 標識ナビゲーター分子）を，血中濃度が 1 μM となるように C57BL/6N マウス（雄，10-13 週齢）に尾静脈投与した．1，2，4，12，24 時間静置した後，採血，採尿し，ヘパリン含有 PBS を全身灌流した後に臓器を摘出した．In vivo イメージャーを用いて臓器の蛍光強度を測定し，Alexa750 標識ナビゲーター分子の体内動態を評価した．

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

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

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

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

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

Kento Koyashiki[1,2], Yusuke Kambe[1], Yoshiaki Hirano[2], Tetsuji Yamaoka[1]
[1]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
[2]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University
[1]Tel: +81-6-6833-5012, FAX: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ncvc.go.jp

1P-037

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

長崎大学　大学院　医歯薬学総合研究科
○菅　忠明，内山詩乃，三浦雄介，萩森政頼，黒田直敬，川上　茂

【緒言】

我々は、高機能・高品質 (High Functionality and Quality: HFQ) 脂質による新たなナノ DDS 製剤調製技術体系の構築に取り組んでいる。これまで、悪性乳癌の HER2 に結合するペプチド (KCCYSL) をリガンドとする KCC-$(SG)_5$-lipid を開発し (T. Suga, et al. *Int. J. Pharm*. 521, 361-364. 2017)、本脂質を用いることで PEG リポソームに HER2 高発現の乳癌細胞への高い指向性を付与できることを報告した。近年、HER2 は膵癌においても発現することが報告されており、膵癌における新たな治療標的として注目されている。一方で、膵癌における HER2 のターゲティングに関する報告はまだ少なく、膵癌細胞に対する HER2 指向 DDS キャリアの有用性は明らかとなっていない。そこで本研究では、これまで我々が開発してきた HER2 指向リポソームが膵癌ターゲティングキャリアとして応用可能であるか検討を行った。

【実験】

KCC-$(SG)_5$-lipid は Fmoc 固相合成により合成し、MALDI-TOF-MS により確認した。KCC-$(SG)_5$-lipid で修飾した PEG リポソームは、KCC-$(SG)_5$-lipid と PEG リポソームを混和 (Post-insertion 法) して調製した。Rhodamine で標識した KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームを細胞に添加してフローサイトメトリーにより定量し、KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームの細胞選択性を評価した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームの細胞内動態を評価した。

【結果と考察】

KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームは、約 100 nm の粒子径および中性の電荷を示した。HER2 を高発現する膵癌細胞株 (PANC-1) および HER2 を低発現する乳癌細胞株 (MDA-MB-231) を用いて KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームの細胞選択性の評価を行ったところ、PANC-1 細胞において KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームの細胞取り込みは、インキュベーション時間およびリポソーム濃度依存的に増加した (Figure 1A)。一方で、MDA-MB-213 細胞においては KCC-$(SG)_5$ 修飾による細胞取り込みの増加をほとんど認められず、KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームは HER2 の発現する膵癌細胞に選択的に取り込まれる可能性が示された (Figure 1B)。また、共焦点レーザー顕微鏡により KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームの細胞内動態を評価した結果、KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームは細胞内においてライソソームマーカーである LysoTracker の蛍光と共局在している様子が観察された。したがって、KCC-$(SG)_5$/PEG リポソームは PANC-1 細胞へ取り込まれ、ライソソームへ輸送される可能性が示された。以上、HER2 指向リポソームによる膵癌細胞のターゲティングに初めて成功した。

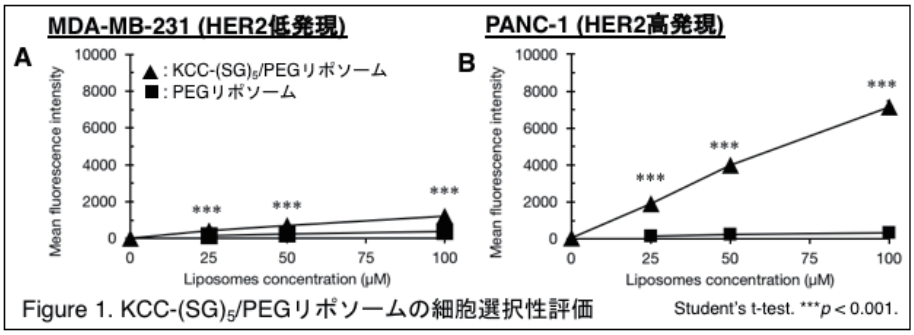


Figure 1. KCC-$(SG)_5$/PEGリポソームの細胞選択性評価

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

Tadaharu Suga, Shino Uchiyama, Yusuke Miura, Masayori Hagimori, Naotaka Kuroda, Shigeru Kawakami
Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
Tel: +81-95-819-8563, Fax: +81-95-819-8563, E-mail: bb55717003@ms.nagasaki-u.ac.jp

1P-038

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

大阪府立大学大学院工学研究科
○中井　志保，弓場　英司，原田　敦史

【緒言】がん化学療法における薬効の増強と、副作用の低減による QOL 向上のために、がん細胞に抗がん剤を効率よく運搬する薬物送達システムの開発が望まれている。当研究室ではこれまで、ポリグリシドールや多糖をベースにしたポリカルボン酸誘導体を固定化した pH 応答性リポソームの開発に成功している。このリポソームは細胞内の弱酸性環境に応答してカルボン酸が疎水化し、エンドソーム膜を不安定化して内包物をサイトゾルに放出した。しかし、pH 応答性を持つがゆえに、リモートローディング法(pH 勾配法)を用いてアントラサイクリン系抗がん剤（ドキソルビシン，Dox）を封入することはできない。そこで本研究は、Dox を封入でき、かつ鋭敏な応答性を実現する pH 応答性高分子修飾リポソームの構築を目的とした。多くの pH 応答性高分子がポリカルボン酸であることに注目し、長鎖アルキル鎖の疎水性相互作用に加え、正荷電を持つ多糖キトサンとの静電相互作用を利用して、Dox 封入キトサン修飾リポソームへ pH 応答性高分子を固定化させ、鋭敏な応答性を持つ pH 応答性リポソームの作製を試みた。

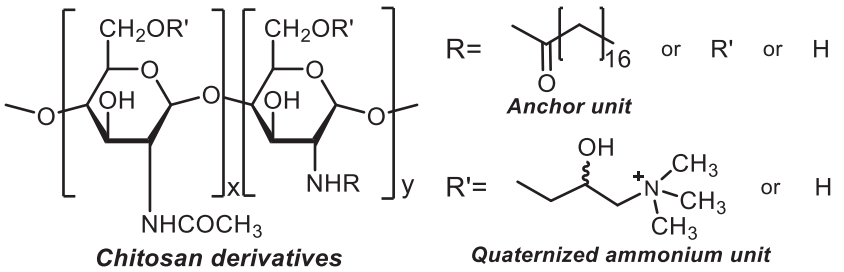


Fig. 1. Structure of stearic and quaternized ammonium cation-introduced chitosan derivatives.

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

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

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

Shiho NAKAI, Eiji YUBA and Atsushi HARADA
Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University
Tel: +81-72-254-9330, Fax: +81-72-254-9330, E-mail: yuba@chem.osakafu-u.ac.jp

1P-039

線維長の制御されたペプチドナノファイバーの作製と抗原デリバリーへの応用

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
○小枝清花，和久友則，田中直毅

【緒言】

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

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

【実験】

1. シード溶液及びペプチド溶液の作製

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

2. シードを用いた線維形成挙動の観察

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

【結果・考察】

シード存在下、種々の濃度のペプチド溶液を 37°C で 24 h インキュベーションした際に形成した会合体を TEM により観察した (Fig. 1)。Fig. 1 から、任意の NFs (n = 50) の平均線維長を測定した。シードに用いた NFs の線維長は 100±50 nm であった。これに対して、ペプチドを共存させた場合には、ペプチド濃度が 5, 10, 15 μM のときに得られたナノファイバーの線維長はそれぞれ、130±60 nm、150±70 nm、200±70 nm であり、ペプチド濃度の増加に伴って線維長が長くなることがわかった。

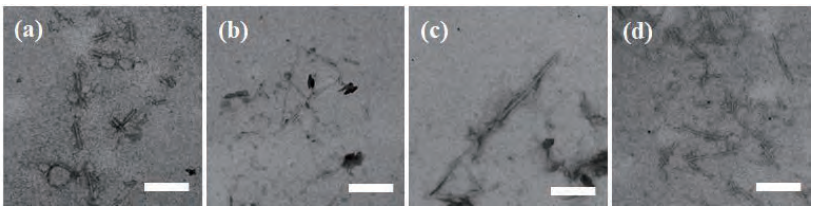


Fig. 1 Negatively stained TEM images of (a) EG_{24} seeds and (b-d) nanofibers obtained by incubation of EG_{24} peptide at various concentrations for 24 h at 37 °C in the presence of seeds (12.5 μM). The peptide concentrations were 5 μM (b), 10 μM (c), and 15 μM (d) (scale bar; 200 nm).

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

Sayaka KOEDA, Tomonori WAKU, Naoki TANAKA (Faculty of Molecular Chemistry and Engineering, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan)
Tel: +81-75-724-7861, Fax: +81-75-724-7861, E-mail: tanaka@kit.ac.jp

1P-040

眼病予防薬剤を内包した高分子超薄膜の調製と機能評価

[1] 東海大学大学院工学研究科，[2] 東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター
○坪井　亮[1]，熊坂　実優[1]，金森　審子[1]，横山　奨[2]，木村　啓志[1,2]，岡村　陽介[1,2]

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

【実験】SiO_2 基板(2 × 2 cm^2)上にポリビニルアルコール(PVA: 10 mg/mL)水溶液を滴下後、スピンコート(4000 rpm, 20 s)して犠牲膜とした。次いで、ポリ乳酸(PLLA: 10 mg/mL)/ルテイン(0-10 mg/mL)/α-トコフェロール(0-10 mg/mL)の混合クロロホルム溶液を滴下して同条件下でスピンコート後、基板ごと純水中に浸漬させることでルテイン内包ナノシートを調製した。得られたナノシートを SiO_2 基板に貼付し、微細形状測定器(Dektak XT, Bruker 社製)にて膜厚を測定した。また、ナノシートを再溶解後、マイクロプレートリーダー(SH-9000, コロナ電気社製)にて吸光度を測定し、ルテイン濃度を定量した。

【結果と考察】SiO_2 基板上に PVA、ルテイン含有 PLLA 溶液の順にスピンコートした。基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲膜が瞬時に溶解し、基板の形状を維持した状態でナノシートを回収できた。得られたナノシートはルテイン由来の黄色を呈していた。この時、ルテイン濃度の上昇に伴い、膜厚と内包量が増加していた(**Fig. 1**)。よって、ルテインの濃度調整によって膜厚･内包量の制御が可能であると示唆される。上述のように、ルテイン内包ナノシートは黄色を呈しているが、数日経過すると無色透明に変化した。そこで、抗酸化剤である α-トコフェロールを添加したところ、ルテイン内包ナノシートの黄色が維持されることが確認できた。実際、吸光度測定の結果から、α-トコフェロールの併用により少なくとも 1 週間はルテイン由来の吸収が維持されていた(**Fig. 2**)。従って、α-トコフェロールの添加はルテインの機能維持に有効であることを見出した。また、α-トコフェロール最適濃度として、少なくとも 0.01 mg/mL の添加でルテインの吸収が維持されることを確認した。現在、ルテインの機能性評価としてヒト細胞株への紫外線吸収試験、並びに涙液への徐放試験を検討しており、当日併せて報告する。

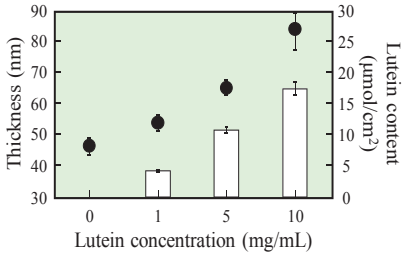


Fig. 1 Correlation of thickness and lutein content of nanosheets with lutein concentration.

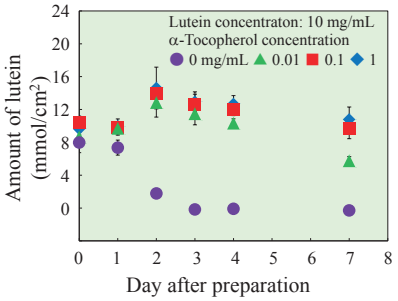


Fig. 2 Stability of lutein into the nanosheets day after preparation.

【参考文献】

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

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

Ryo Tsuboi[1], Miyu Kumasaka[1], Akiko Kanamori[1], Sho Yokoyama[2], Hiroshi Kimura[1,2], Yosuke Okamura[1,2]
[1]Graduate School of Engineering, Tokai University
[2]Micro/Nano Technology Center, Tokai University
[1]Tel: 0463-58-1211 (Ex. 4692), Fax: 0463-50-2456, E-mail: 7BAJM029@cc.u-tokai.ac.jp, y.okamura@tokai-u.jp

1P-041

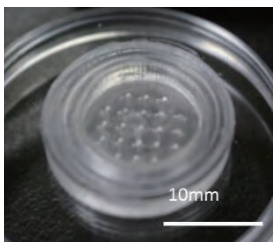
インプランタブル細胞培養デバイスの開発

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

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

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

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



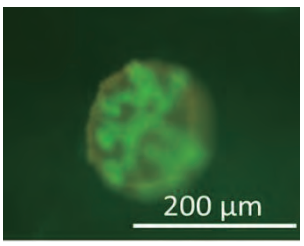


図 1．細胞培養リザーバ　図 2. シート上の細胞

Development of an implantable cell culture device

Hideto Kojima[1], Nobuhiro Nagai[2],Matsuhiko Nishizawa[1], Toshiaki Abe[2], Hirokazu Kaji[1]
[1]Graduate School of Engineering, Tohoku University [2]Graduate School of Medicine, Tohoku University
Tel: +81-022-795-3586, Fax: +81-022-795-3586, E-mail: hideto.kojima.t4@dc.tohoku.ac.jp

1P-042

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

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

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

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

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

【参考文献】

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

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

Shota Yamamoto[1], Yoshifumi Iwamaru[2], Yoshihisa Shimizu[1], Kazuo Yamaguchi[3], Jun Nakanishi[1]
[1]National Institute for Materials Science, International Center for Materials Nanoarchitectonics
[2]National Agriculture and Food Research Organization
[3]Department of Chemistry, Kanagawa University
Tel: +81-29-860-4569, Fax: +81-29-860-4706, E-mail: NAKANISHI.Jun@nims.go.jp

1P-043

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

[1] 大阪市立大学大学院工学研究科, [2] 大阪府立大学 BNCT 研究センター, [3] 京都大学複合原子力科学研究所
○堂脇 聖史 [1], 松浦 昂紀[1], 河崎 陸 [1], 服部 能英 [2], 櫻井 良憲 [3], 増永 慎一郎 [3], 切畑 光統 [2], 長﨑 健 [1]

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

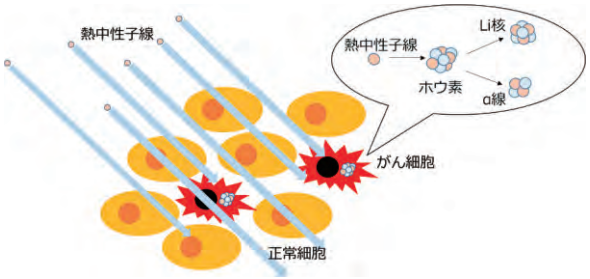


Fig.1 Principle of BNCT

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

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

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

Satoshi Dowaki[1], Koki Matsuura[1], Riku Kawasaki [1], Yoshihide Hattori[2], Yoshinori Sakurai[3], Shinichiro Masunaga[3], Mitsunori Kirihata[2], Takeshi Nagasaki[1]
[1]Graduate School of Engineering, Osaka City University, [2]Research Center for BNCT, Osaka Prefecture University, [3]Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University
Tel: +81-06-6695-2695 , E-mail: s.dowaki.5121@gmail.com

1P-044

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

[1] 九州大学大学院歯学研究院，[2] 名古屋大学未来材料・システム研究所
○林　幸壱朗[1,2]，丸橋　卓磨[2]，坂本　渉[2]，余語　利信[2]

【緒言】
肝硬変は肝臓が線維化し本来の機能を果たせなくなった状態である。線維化が進行すると、肝性脳症や食道静脈瘤などの重篤な症状や合併症が現れる。さらに、食道静脈瘤が破裂すると大量の出血によりショック死を招く。また、線維化により肝がんのリスクも高まる。
本研究では、①線維化を引き起こす二種類の細胞（クッパー細胞と肝星細胞）をターゲティングする機能、②これらの細胞内の活性化を阻害する物質を細胞内で放出する機能、③線維化を引き起こす活性酸素を除去する機能を併せ持つ有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子を合成し、このナノ粒子を用いて線維化した組織を修復し、肝機能を回復させることを試みた。

【実験】
チオールまたはチオシアネートを有するシリコンアルコキシドを用いた加水分解・縮合反応により、有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子を one-pot で作製した[1]。有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子の構造および機能をラマン、FTIR、TEM 等により解析した。
マウスへの四塩化炭素継続的投与により肝線維症を誘発した。肝線維症マウスに有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子を投与し、免疫組織染色および生化学検査により治療効果を評価した。

【結果と考察】
有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子の骨格はジスルフィドとシロキサンからなり、ナノ粒子表面にはチオールを有していた。このような構造をもつため、この有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子はクッパー細胞が作り出す活性酸素を除去した。さらに、細胞内において有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子は崩壊し、肝星細胞の増殖と損傷部への遊走性を阻害する物質を放出した。
有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子を肝繊維症マウスに静脈内投与したところ、肝組織の免疫染色により、有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子はクッパー細胞および肝星細胞をターゲティングすることが明らかになった。さらに、有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子の静脈内投与を週一回のペースで二週間行うと、線維化した組織が修復され、肝機能が回復することが、肝組織のシリウスレッド染色および生化学検査により明らかになった。

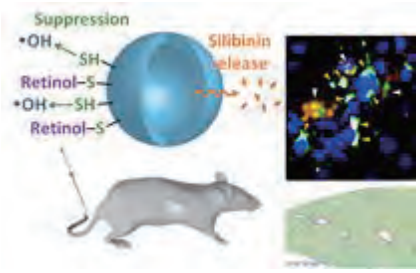


図. 有機–無機ハイブリッド中空ナノ粒子（左上）を肝繊維症マウスに静脈内投与するとクッパー細胞及び肝星細胞に選択的に集積し（右上）、繊維化の程度を改善させ（右下）、肝機能を回復させた。

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

[1] Hayashi et al. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 8613.
[2] Hayashi et al. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1706332.

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

Koichiro Hayashi[1,2], Takuma Maruhashi[2], Wataru Sakamoto[2], Toshinobu Yogo[2]
[1]Department of Biomaterials, Faculty of Dental Science, Kyushu University
[2]Division of Materials Research, Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University
Tel: +81-92-642-6345, Fax: +81-92-642-6348, E-mail: khayashi@dent.kyushu-u.ac.jp

1P-045

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

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻
○沖田　一歩，村上　義彦

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

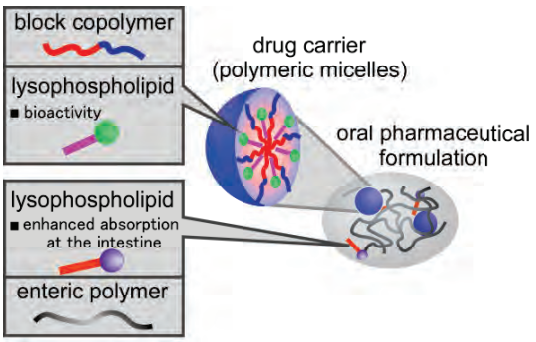


Fig. 1 Preparation of oral pharmaceutical formulation containing lipid-polymeric micelles

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

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

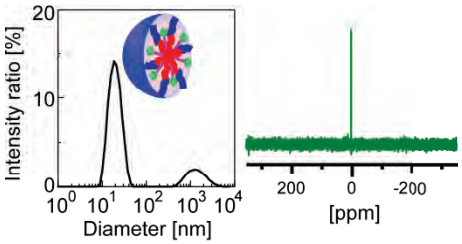


Fig. 2 Particle size distribution and ^{31}P-NMR spectrum of lipid-polymeric micelles

Development of lipid-polymeric micelle for oral drug delivery
- evaluation of formation and structure of polymeric micelles -
Ichiho Okita, Yoshihiko Murakami
Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology
Tel/Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

1P-046

自発的な核内移行性を有するナノゲルの開発と核内物質輸送特性の解析

甲南大学フロンティアサイエンス学部生命化学科
○長濱 宏治、秋山 雄大、中西 健太

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

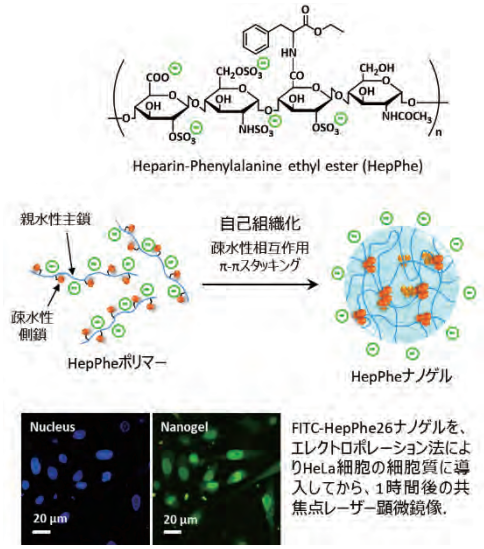


Figure 1. インポーチン模倣ナノゲルの構造および特徴

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

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

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

Koji NAGAHAMA, Yudai AKIYAMA and Kenta NAKANISHI
Department of Nanobiochemistry, Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University
Tel: 078-303-1328, Fax: 078-303-1495, E-mail: nagahama@center.konan-u.ac.jp

1P-047

イオン液体の生体適合性の向上と DDS への応用

[1]九州大学大学院工学研究院　応用化学部門, [2]九州大学次世代経皮吸収センター, [3]九州大学未来化学創造センター
○田原　義朗[1], 森田　佳歩[1], Md. Raihan Chowdhury[1], Rahman Md Moshikur[1], 若林　里衣[1,2], 神谷　典穂[1,2,3], 後藤　雅宏[1,2,3]

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

1. PTX の水溶化
【実験】コリンとアミノ酸からなる IL を合成し、PTX の溶解性と Hela 細胞に対する毒性について WST-8 アッセイによって評価した。得られた PTX 溶解 IL を EtOH と Tween80 によって PBS 中に溶解し、Hela 細胞への毒性と、THP-1 細胞への感作性試験を行なった。
【結果と考察】コリン-グリシンからなる IL (Fig.1A) が、最も高い PTX の溶解性を示し、細胞毒性も低かった。さらに PTX を溶解した IL/EtOH/Tween80/PBS は、実用化されている TAXOL と同等の Hela 細胞への毒性を示したが、THP-1 細胞への感作性は低いという結果となった。以上より、コリン-グリシンからなる IL は生体適合性が高く、難溶解性薬物の新しい溶媒となることが示唆された。

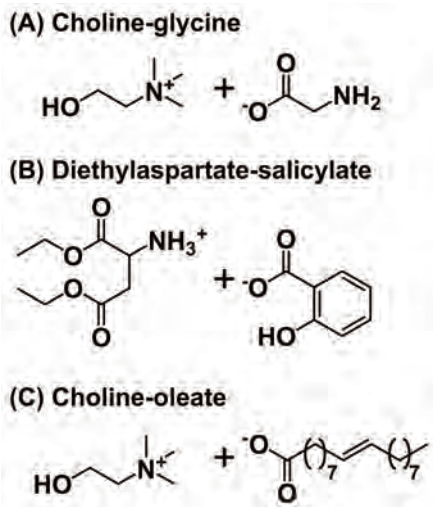


Figure 1 Structure of IL

2. Sal のイオン液体化
【実験】種々のアミノ酸エステルを合成し、細胞毒性を評価した。アミノ酸エステルをカチオン、Sal をアニオンとして IL を合成した。得られたイオン液体化 Sal について皮膚透過性を評価した。
【結果と考察】アスパラギン酸、プロリン、アラニンのエチルエステルが低い細胞毒性を示した。これらのイオン液体化 Sal は、どれも塩酸塩よりも高い皮膚透過性を示した。透過性はアスパラギン酸エチルエステル（Fig. 1B）を用いた場合が最も高く、カチオンの疎水性と相関があった。

3. ペプチドの経皮デリバリー
【実験】卵白アルブミンのエピトープペプチド（水溶性、分子量 1,400）をコリン-オレイン酸からなる IL（Fig. 1C）に溶解後、経皮吸収促進効果のある油状基剤 isopropyl myristate（IPM）に溶解した。得られたペプチドの油状製剤について皮膚透過実験を行なった。
【結果と考察】水溶性ペプチドを IL によって IPM 中に均一に分散させることに成功した。ペプチドの PBS 溶液と比較すると、IL を含む油状製剤は高い皮膚透過性を示すことが明らかとなった。

Improvement of Biocompatibility of ionic liquid for drug delivery systems

Yoshiro Tahara[1], Kaho Morita[1], Md. Raihan Chowdhury[1], Rahman Md Moshikur[1], Rie Wakabayashi[1,2], Noriho Kamiya[1,2,3], Masahiro Goto[1,2,3]
[1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, [2]Center for Transdermal Drug Delivery and [3]Center for Future Chemistry, Kyushu University
Tel: +81-92-802-2811, Fax: +81-92-802-2810, E-mail: tahara.yoshiro.181@m.kyushu-u.ac.jp

1P-048

超音波応答性ナノバブルを用いた水溶性薬物の脳内送達法の開発と評価

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医薬品情報学分野
○川上　茂，三浦　雄介，佐藤　大樹，渕上　由貴，萩森　政頼

【緒言】
脳に対する外部刺激応答性薬物送達法として、超音波応答性のガスを封入したバブル製剤の血管内投与と、脳への超音波照射を組み合わせた方法が着目されている。しかしながら、薬物を効果的に脳内に送達することのできるバブル製剤や超音波照射条件の最適化は十分とはいえず、本送達法の臨床応用を実現するためには、詳細な制御因子の探索が不可欠となる。
我々はこれまで、脳マイクロダイアリシス法を用いた脳内物質の経時的な濃度の評価を行っており、本法を用いて水溶性薬物の脳内送達後の薬物動態を評価することで、効果的かつ安全な脳内薬物送達の条件を探索できると考えた。本研究では、水溶性薬物の抗がん剤モデルとして 5-フルオロウラシル（5-FU）を、薬効モデルとしてアスコルビン酸を、それぞれ選択し、マウスまたはラット脳内送達後の経時的な薬物動態を評価した。さらに、超音波およびナノバブルの条件をそれぞれ変化させ、脳内薬物送達に対するそれぞれの因子の影響を評価した。

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

【結果と考察】
「１．薬物投与のみ」「２．薬物＋ナノバブル投与」「３．薬物投与＋超音波照射」「４．薬物＋ナノバブル投与＋超音波照射」の 4 群にて比較したところ、「４．薬物＋ナノバブル投与＋超音波照射」が他の群よりも脳内薬物移行量が有意に増加した。このことから、ナノバブル投与と脳への超音波照射を組み合わせることで、水溶性薬物の脳内送達が可能になると考えられる。また、アスコルビン酸の抗酸化能も同様の群間で比較すると、脳内薬物移行量に似た経時変化を示し、薬効を維持したまま脳内へと送達されていることが示唆された。したがって、ナノバブル投与と脳への超音波照射を組み合わせると、水溶性薬物の薬効を維持したまま効果的に脳内へと送達することができると考えられる。
さらに、5-FU を用いて超音波強度、超音波照射時間、ナノバブル投与量を 3〜4 段階で変化させたところ、マウス脳内薬物移行量はナノバブル投与量に応じた変化が観察された。この結果は既報とも一致するものであり、バブル製剤の投与量が脳内薬物移行における重要な因子のひとつであることが支持されたと考えられる。

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

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

Shigeru Kawakami, Yusuke Miura, Hiroki Sato, Yuki Fuchigami, Masayori Hagimori
Department of Pharmaceutical Informatics, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
Tel: +81-95-819-8563, Fax: +81-95-819-8563, E-mail: skawakam@nagasaki-u.ac.jp

1P-049

セラノスティクスを志向した多機能性キレートナノメディシンの開発

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

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

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

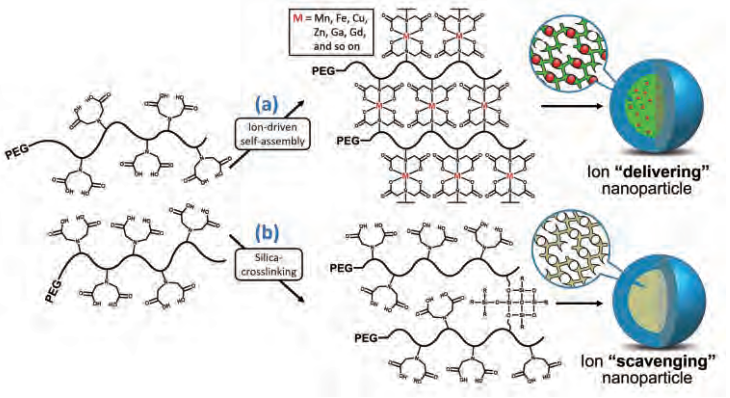


Figure 1. Schematic structure of the chelating nanoparticles

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

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

Ahram Kim[1], Yukio Nagasaki[1,2,3]
[1]Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba
[2]Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba
[3]Center for Research in Isotopes and Environmental Dynamics (CRiED), University of Tsukuba
Tel: +81-29-853-1002 (Ext. 8288), Fax: +81-29-853-5749, E-mail: s-ahramkim@ims.tsukuba.ac.jp

1P-050

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

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

【緒言】
近年，ポリ乳酸（PLA）等の生分解性高分子を足場材料とした再生医療に期待が寄せられている。臓器のような階層的構造を有する組織の再生には，その構造を模倣した足場-細胞複合体を作成することが有効であると考えられる。それには，多種の細胞認識素子を材料表面の任意の位置に導入し，特定の細胞を足場上の望む位置に配置する技術の開発が必要である。特定の配列を有する DNA をタグとして材料の特定部位に導入できれば，それと配列特異的に結合する DNA-細胞認識素子の相補的結合により任意の場所に細胞認識素子を配置できると考えられる。PLA 材料等を成形後，直接 DNA を化学修飾する場合 [1]，その配置範囲を限定した異なる配列の DNA の修飾や，固定化密度の制御が困難である。この問題は，予め大量合成した DNA-PLA 結合体を 3D プリンタやインクジェットプリンタなどを用いた手法と組み合わせて，成形体表面に導入することで解決可能であると考えられる。一方，我々はポリエチレングリコール(PEG)-DNA 結合体を液相法により大量合成する手法の開発に成功している [2]。本研究では，この液相大量合成法により合成した PEG 結合 DNA と PLA をカップリングし，DNA-PLA 結合体を合成した。さらに，そのタグと特異的に結合可能な配列を有する DNA(adaptor DNA: aDNA)と細胞認識素子を結合させた aDNA-細胞認識素子結合体を用いて，DNA が細胞認識素子修飾のためのタグ-アダプターとして使用可能かどうかを材料表面上の細胞接着挙動などにより評価した(Fig. 1)。

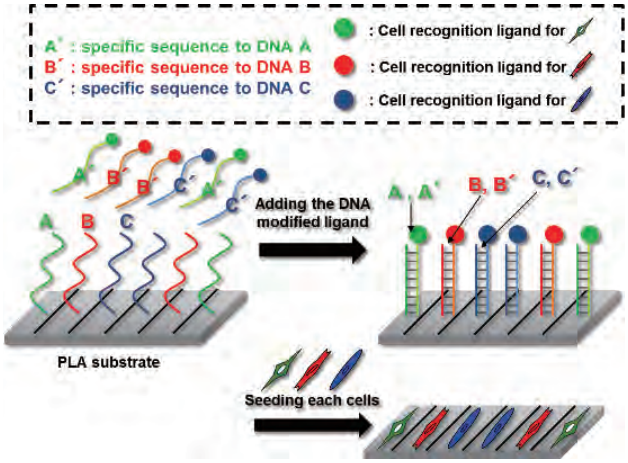


Fig 1. Preparation of PLA surface immobilizing various cell-specific ligands at desired areas using complementary DNAs as tag/adaptor.

【実験・結果および考察】
ヘテロ二官能 PEG(HO-PEG_{10k}-NH_2)を出発物とし，水酸基にデオキシグアノシン(dG)を 3 塩基伸長した PEG-DNA 結合体(dG_3-PEG_{10k}-NH_2)を合成した。これとスクシンイミド化 PLA とのカップリング反応により，DNA-PLA 結合体(dG_3-PEG_{10k}-*b*-PLA_{3k})を合成した。続いて，aDNA が基盤上の DNA 部を介して結合することで，材料表面上に aDNA が固定可能か調査した。DNA-PLA 結合体溶液を PLA フィルム表面に塗布し，これに aDNA-FAM 水溶液を接触させ，蛍光顕微鏡観察を行ったところ，塗布面にのみ蛍光が観測され aDNA-FAM が結合したことが確認された。さらに細胞接着性ペプチドである RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser)または REDV(Arg-Glu-Asp-Val)を結合した aDNA-ペプチドを先と同様の方法でそれぞれの PLA フィルム上に固定化した。細胞認識リガンドを RGDS とした場合は L-929 マウス繊維芽細胞に対して，細胞認識リガンドを REDV とした場合はヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)に対して，それぞれの系での細胞接着を調査した。その結果，各細胞に特異性を持つ aDNA-細胞認識ペプチドを固定化した場合，塗布部に対する細胞接着性が高かったことから，材料表面上に細胞認識ペプチドの固定化が可能であり，それを介した特異的接着が示唆された。

1) T. Matsui, H. Iwata *et al.*, *Acta Biomater.*, **2015**, *13*, 32-41.
2) S. Tanaka, A. Kuzuya *et al.*, *Chem. Asian J.*, **2017**, *12*, 2388-2392.

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

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

1P-051

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

[1] 東理大院基礎工，[2] 東女医大先端生命研
○知念　宙 [1,2]，中山　正道 [2]，菊池　明彦 [1]，大和　雅之 [2]，岡野　光夫 [2]

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

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

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

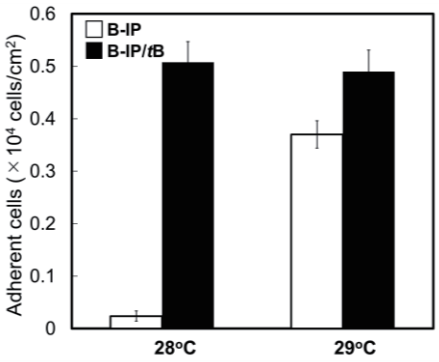


Fig. 1 Temperature-dependent cell adhesion on B-IP/*t*B and B-IP surface. Cell seeding density: 1 x 10^4 cells/cm^2, culture period: 24 h, mean ± SD (n=3).

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

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

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

Hiroshi CHINEN[1, 2], Masamichi NAKAYAMA[2], Akihiko KIKUCHI[1], Masayuki YAMATO[2] and Teruo OKANO[2] ([1]Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci., 6-3-1 Niijuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan, [2]Inst. Adv. Biomed. Eng. & Sci., Tokyo Women's Med. Univ. (TWIns), 8-1 Kawadacho, Shinjuku, Tokyo 162-8666, Japan)
[2]Tel: +81-3-3353-8112 (Ext. 43215), Fax: +81-3-3359-6046, E-mail: nakayama.masamichi@twmu.ac.jp

1P-052

3D 足場材料としての単層 β−ヘアピンペプチドハイドロゲルの設計

[1] 関西大化学生命工, [2] 関西大先端機構
○横川亮祐 [1]・聶 文希 [1]・柿木佐知朗 [1,2]・平野義明 [1,2]

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

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

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

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

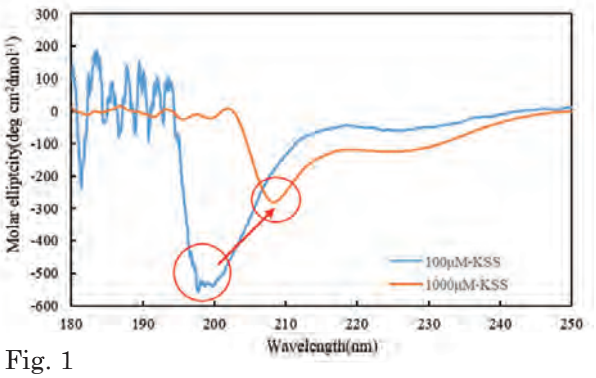


Fig. 1
CD spectra of 100μM and 1000μM KSS in H_2O

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

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

Ryosuke YOKOKAWA[1] , Ayaki JO[1] , Sachiro KAKINOKI [1,2], Yoshiaki HIRANO[1,2]
[1]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, [2]Kansai University, Organization for Research and Development of Innovative Science and Technology
Tel: 06-6368-0974 , e-mail: yhirano@kansai-u.ac.jp

1P-053

細胞パターニング基材の開発を目的とした光応答性ポリマーフィルムの創製

[1] 関西大学化学生命工学部，[2] 関西大学 ORDIST
○東野　美玲[1]，野口　貴史[1]，河村　暁文[1,2]，宮田　隆志[1,2]

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

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

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

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

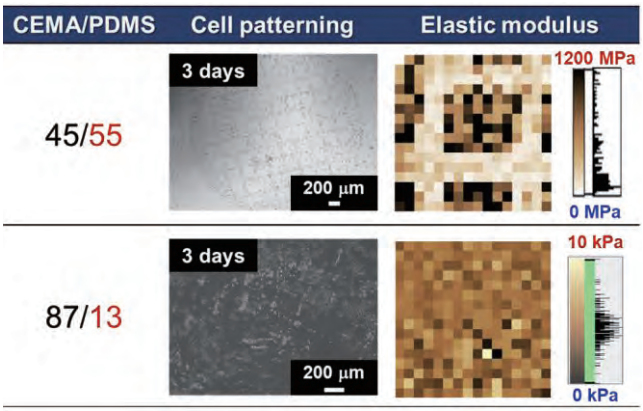


Fig. 1. Adhesion of L929 cells onto PCEMA-*g*-PDMS films surface-patterned by UV irradiation through a photomask and elastic modulus of their film surfaces.

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

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

1P-054

生分解性アルデヒド導入セルロースを用いた足場材料に関する研究

北陸先端大院マテリアル
○袁喜達・松村和明

【緒言】

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

【実験】

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

【結果と考察】

ヨウ素滴定法の結果、過ヨウ素酸ナトリウムの濃度の増加とともに、酸化セルロースのアルデヒド導入量が増加した。アルデヒド導入率はコントロールできた。また XRD 測定の結果、セルロースの結晶構造は、過ヨウ素酸ナトリウムおよびグリシンとの反応により大きく変化していないことがわかった。図１と図２に 12%と 15%過ヨウ素酸ナトリウム溶液で酸化セルロースを凍結乾燥したサンプルの SEM 観察像からわかるようにポーラスな構造が観察された。そして、アルデヒド導入率の増加とともに、小孔のサイズ増大することが判明した。凍結乾燥した CP-12 を細胞培養液に浸漬し、溶解状況を観察した結果、約一週間形を保つことができた。今後凍結乾燥した酸化セルロースに細胞を接種し、足場材料としての応用を試みする。

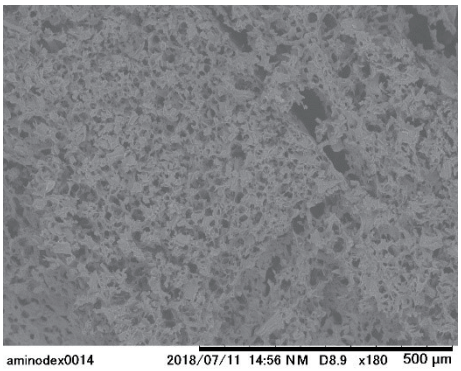


Fig1. SEM photograph of freeze-dried CP12

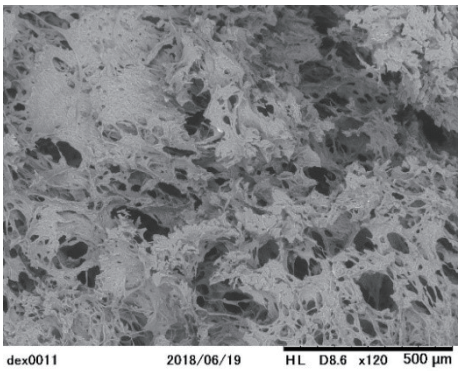


Fig2. SEM photograph of freeze-dried CP15

【参考文献】

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

Degradation control of aldehyde-introduced cellulose

Xida YUAN, Kazuaki MATSUMURA, (School of Material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1211, Japan)
Tel: +81-7-6151-1680, E-mail: mkazuaki@jaist.ac.jp

1P-055

高濃度化で発現した哺乳類コラーゲンの感熱応答挙動の解析

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

【緒言】ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) に代表される感熱応答性高分子は、温度に依存した水和と脱水により相転移を示す高分子であり [1]、医療材料として幅広く研究されている。天然由来の感熱応答性高分子として、これまで、PNIPAAm 修飾ゼラチン [2] や、プロピル化ポリ (γ-グルタミン酸) [3] などが報告されているが、医療分野への応用を考えた場合、合成高分子の使用は細胞毒性などが懸念される。そこで、完全天然型の感熱応答性高分子を作製できれば、医療や創薬分野など幅広い応用が期待される。



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

我々は最近、ブタ皮膚由来 I 型コラーゲンを細断化したコラーゲンマイクロファイバー (CMF) が、ゲル化とゾル化を可逆的に示すことを見出した (Figure 1)。本発表では、その感熱応答性のメカニズムと応用を報告する。

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

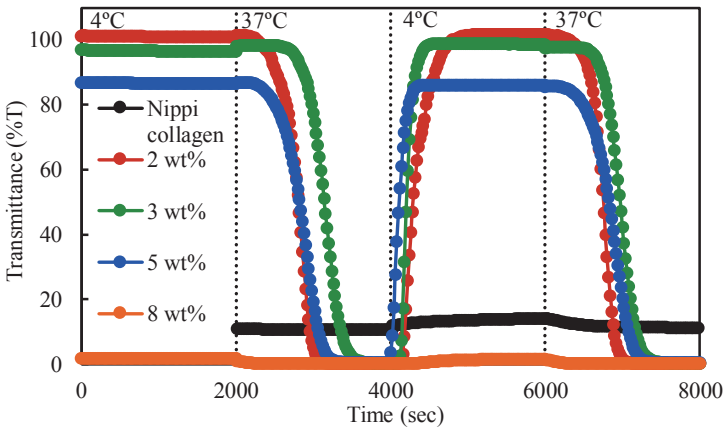


Figure 2. Transmittance of 2-8 wt% CMF solutions and Nippi collagen solution.

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

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

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

Thermo-responsivity of mammalian collagen expressed at high concentration

Yuichi YUKAWA[1], Hirotaka NAKATSUJI[1,2], Shinji IRIE[2] and Michiya MATSUSAKI[1,2,3]
[1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN [2]Joint Research Laboratory (TOPPAN) for Advanced Cell Regulatory Chemistry [3]JST-PRESPO
[1]Tel: +81-6-6879-7357, Fax: +81-6-6879-7359, E-mail: m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

1P-056

β-グルカンを用いた細胞分化誘導の抑制

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

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

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

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

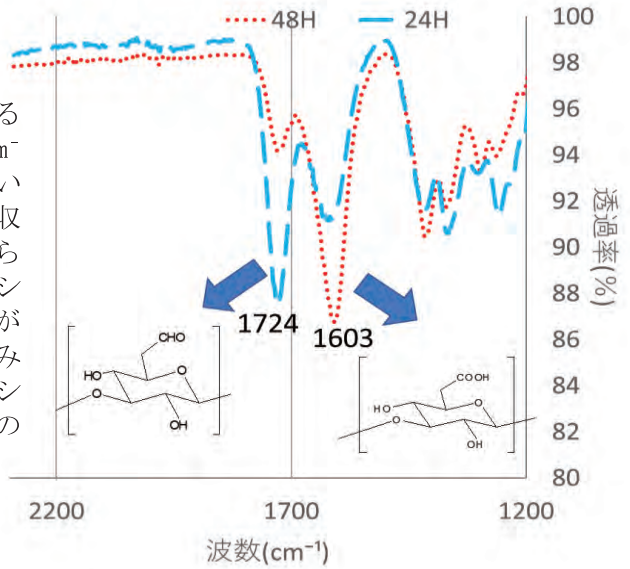


図 1 , IR 測定結果

Biomaterials: Suppression of cell differentiation induction using β-glucan

Tomonori Nogami[1], Kazuo Sakurai[1], Shinichi Mochizuki[1]
[1]Graduate School of Environmental Engineering, [1]Graduate Programs in Environmental Systems, [1]The University of Kitakyushu
Tel: +81-093-695-3310,　E-mail: admin-sec@kitakyu-u.ac.jp

1P-057

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

東京工業大学物質理工学院
○前田　亨，澤田　敏樹，芹澤　武

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

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

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

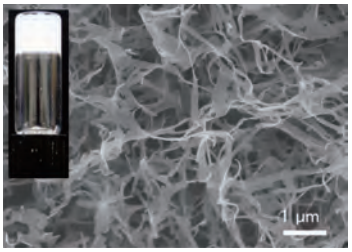


Figure 1. SEM image of the xerogels prepared by lyophilization of the hydrogels. Inset: Photo of the hydrogel.

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

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

Tohru MAEDA, Toshiki SAWADA, Takeshi SERIZAWA (Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1-H121 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan)
Tel&Fax: +81-3-5734-2128, E-mail: serizawa@polymer.titech.ac.jp

1P-058

単層/スフェロイド培養における間葉系幹細胞の特性比較

北九州市立大学
○徳永　優斗，宮本　大輔，中澤　浩二

【緒言】

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

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

【実験】

スフェロイド培養デバイスとして、独自のマイクロウェルチップ技術を利用した。このチップは、培養基板上に数百ミクロンの微小空間（マイクロウェル）が規則的に多数配置され、その表面をポリエチレングリコールで修飾することによってマイクロウェル内でスフェロイド形成を促進する構造となっている（図 1）。また、二次元単層培養には組織培養ディッシュを利用した。これらの培養デバイスにヒト骨髄由来間葉系幹細胞株である UE7T-13 細胞を播種し、両培養系における細胞特性を比較した。

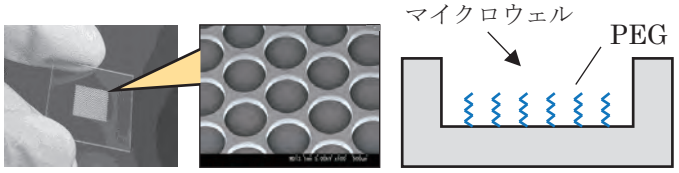


図 1. マイクロウェルチップ

【結果と考察】

単層培養では、組織培養ディッシュ底面に接着した細胞が平面方向に伸展し増殖した。スフェロイド培養では、マイクロウェル内に保持された細胞が自発的に集合・凝集化し、播種後数時間内にスフェロイドを形成した（図 2）。また、一つのウェルには 1 個のスフェロイドが形成され、スフェロイド形態を維持したまま少なくもと一週間以上培養が可能であった。

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

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

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

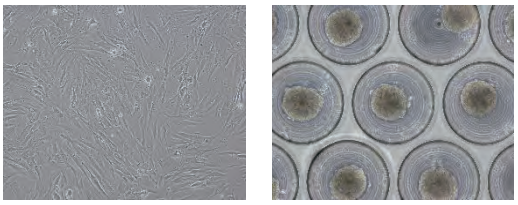


図 2. 単層/スフェロイド培養の間葉系幹細胞

Characteristics comparison of mesenchymal stem cells in monolayer and spheroid cultures

Yuto TOKUNAGA, Daisuke MIYAMOTO, and Kohji NAKAZAWA
Department of Life and Environment Engineering, The University of Kitakyusyu
Tel: +81-93-695-3292, Fax: +81-93-695-3359, E-mail: nakazawa@kitakyu-u.ac.jp

1P-059

表面修飾したジルコニア上における脂肪由来間葉系幹細胞の細胞挙動評価

[1] 早稲田大学理工学術院, [2] 産業技術総合研究所健康工学研究部門, [3] 産業技術総合研究所電子光技術研究部門
○矢野　玄[1], 橋本　祥吾[1], 安永　茉由[2], 廣瀬　志弘[2], 欠端　雅之[3], 屋代　英彦[3], 山﨑　淳司[1], 伊藤　敦夫[2]

【緒言】

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

【実験】

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

【結果と考察】

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

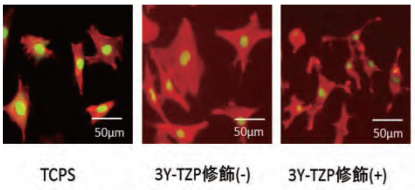


図 1. 各材料上における ADMSC の蛍光顕微鏡画像
赤色：細胞骨格、緑色：核

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

Gen Yano[1], Shogo Hashimoto[1], Mayu Yasunaga[2], Motohiro Hirose[2], Masayuki Kakehata[3], Hidehiko Yashiro[3], Atsushi Yamazaki[1], and Atsuo Ito[2]
[1] Faculty of Science and Engineering ,Waseda University
[2] Health Research Institute, Natl. Inst. of Adv. Industrial Sci. and Tech. (AIST)
[3] Electronics and Photonics Research Institute, Natl. Inst. of Adv. Industrial Sci. and Tech. (AIST)
Tel: +81-087-869-4218, Fax +81-029-861-6149, E-mail: gentle7939@gmail.com

1P-060

Polyrotaxane surfaces for regulating osteogenic differentiation

[1]Section of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, [2]Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
○Arun Kumar Rajendran[1], Yoshinori Arisaka[2], Nobuhiko Yui[2], Sachiko Iseki[1]

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

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

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

Polyrotaxane surfaces for regulating osteogenic differentiation
Arun Kumar Rajendran[1], Yoshinori Arisaka[2], Nobuhiko Yui[2], Sachiko Iseki[1]
[1] Section of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
[2] Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5803-5579, Fax: +81-3-5803-0213, E-mail: s.iseki.emb@tmd.ac.jp

1P-061

機能性分子の直交型固定によるハイドロゲル基材への細胞培養機能付与

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

【緒言】

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

【実験及び結果と考察】

1.C-SA-SC 導入ハイドロゲルの異種機能性分子固定化機能評価

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

2.機能性分子固定化ハイドロゲルを用いた細胞培養

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

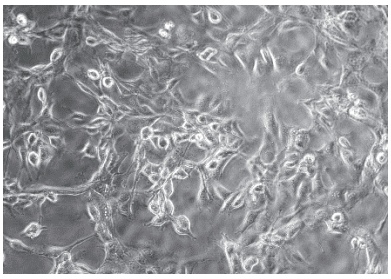


Fig. 1 Adhesion of NIH3T3 cells on biotin-RGDS immobilized PEG-based hydrogel

Providing cell culture functions to hydrogels by orthogonal immobilization of functional molecules

Yusei Hamada[1], Kosuke Minamihata[1], Wahyu Ramadhan[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] *
[1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering [2]Center for future Chemistry, Kyushu University
*Tel: +81(0)92-802-2807, E-mail: kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

1P-062

カチオン性/温度応答性ブロック共重合体高分子ブラシを用いた細胞分離技術の検討

慶應義塾大学大学院 薬学研究科
○太田 歩，長瀬 健一，金澤 秀子

【緒言】近年、病気や怪我などにより損失した組織や臓器の機能を、細胞を生体内に移植することで人体の再生能力を最大限に引き出して復元させる再生医療が注目を集めている。そのためには移植用細胞を分離、精製する技術が必要である。そこで本研究では、ガラス基板に温度応答性高分子とカチオン性高分子から構成されるブロックコポリマーブラシを修飾した基板を作製し、温度制御による細胞分離を検討した(Fig.1)。カチオン性高分子とのブロック共重合体にすることで、静電的相互作用による細胞接着性の向上を促し、細胞を未修飾、かつ温度変化のみという温和な条件下での細胞分離方法について検討した。

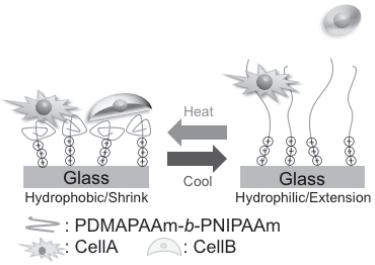


Fig.1 Thermoresponsive-cationic block copolymer brush for cell separation

【実験】ガラス基板表面にカチオン性のジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAAm)を表面開始原子移動ラジカル重合(ATRP)により高密度に修飾した。その後、温度に応答して親水性/疎水性変化を示すポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)を二段階目の ATRP により修飾し、下層にカチオン性、上層に温度応答性を有するブロックコポリマーブラシをガラス基板表面上に作製した。この際、NIPAAm モノマー濃度を調節して、PNIPAAm ブラシの長さが異なるものを作製した。また、比較対照としてカチオン性を持たない PNIPAAm ホモポリマーブラシを作製した。PNIPAAm の分子量を GPC により測定し、作製した高分子修飾基板表面のゼータ電位を測定した。間葉系幹細胞(MSC)、ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)のゼータ電位を測定した。作製した高分子修飾基板に MSC、NHDF を播種し、37 ℃での基板への接着挙動、20 ℃での基板からの脱着挙動を観察した。

【結果と考察】GPC により上層の PNIPAAm の分子量は ATRP の際のモノマー濃度の増加に伴い増加していることがわかった。また、ゼータ電位の測定により、基板表面が正荷電に、細胞表面が負荷電に帯電していることがわかった。基板への細胞の接着挙動を確認したところ、温度 37 ℃では MSC、NHDF ともに基板に接着している様子が確認された(Fig.2)。温度を 20 ℃に変化させると、接着していた MSC、NHDF は基板から脱着した。これらの結果から、基板表面に修飾されたブロックコポリマーブラシ上層部の PNIPAAm が温度変化により親水性/疎水性変化を促し細胞の接着・脱着を起こしたと考えられる。また、PNIPAAm の分子量が大きい基板では、MSC、NHDF の接着性は減少した。また、カチオン性を有するブロックコポリマーは、PNIPAAm ホモポリマーと比較して接着性が向上した。20℃での脱着挙動を観察したところ、NHDF はブロックコポリマーの正電荷の影響で脱着が大きく抑制された。これらの検討から作製した高分子修飾基板は、細胞種によって異なる接着性・脱着性を示し、温度変化による細胞分離への応用の可能性を示した。

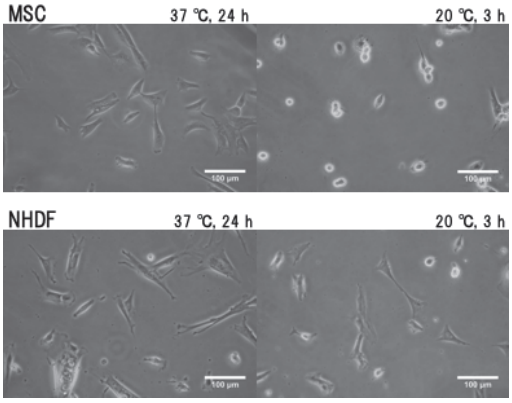


Fig.2 Cell morphologies on thermoresponsive-cationic block copolymer brushes at 37 and 20 ℃ observed after 24 and 3 h incubations respectively

Temperature-modulated Cell Separation using Thermoresponsive-Cationic Block Copolymer Brushes

Ayumu Ota, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa
Graduate School of Pharmacy, Keio University
Tel: +81-3-5400-1378, Fax: +81-3-5400-1378, E-mail: nagase-kn@pha.keio.ac.jp

1P-063

ポリ乳酸足場材料上の軟骨細胞培養及び分化の評価

東京工業大学　[1]生命理工学院，[2]東京農業大学　生命科学部　分子生命化学科
○チュウ　モウチェン[1]，川村　勇樹[1]，廣江　綾香[2]，田口　精一[2]，田川　陽一[1]

【緒言】関節の軟骨は骨の端を覆い、関節運動を行う際に重要な役割を果たしている。関節軟骨は軟骨細胞と細胞外マトリックスのⅡ型コラーゲン及びアグリカンにより作られ、滑らかな関節運動を支え、衝撃を和らげる役割を果たす。ケガや加齢などの原因による関節軟骨が受ける損傷は自己修復が難しい。関節軟骨内には血管が存在していないため、自己再生能力がない。現在、変形性関節症などの関節軟骨の損傷に対する治療法として、自己骨軟骨細胞移植などが試みられている。しかし、線維軟骨の形成などの問題が残っており、安定な臨床プロトコルが確立されていない。ポリ乳酸は生体吸収性ポリマーとして幅広く研究されており、水分により加水分解される。加水分解後の生成物としての乳酸が生体内にて代謝可能であり、生体適合性、安全性、力学的強度などが優れていることから、バイオマテリアルとして研究・利用されている。そこで、我々は軟骨組織形成に最適なスキャフォールドとして、ポリ乳酸を基礎とした材料の開発をおこなっている。

【実験】ウサギ軟骨細胞を一定の細胞数で 24 ウェルプレート内の 3D スキャフォールド上に播種した。その後、7 日間軟骨細胞増殖用メディウムで培養した後、軟骨細胞分化用メディウムに切り替え、分化させた。アルシアンブルー（アグリカン）とヌクレアファストレッドアルミニウム硫酸溶液（細胞核）を用いて染色し、アルシアンブルー染色の程度で評価を行った。

【結果と考察】生体吸収性のあるポリ乳酸を主材料とする基材をスキャフォールドとし作製した。まず、２D のポリ乳酸シートで培養したところ、軟骨細胞の軟骨組織形成がアルシアンブルー染色で確認できた。そこで、軟骨の欠損部は立体的な環境であるので、多孔性の 3D スキャフォールドを作製した。その３D スキャフォールドで、軟骨細胞を分化用メディウムで培養し、1-3 週後について、時間の推移につれて、軟骨組織への分化が進んでいることがアルシアンブルー染色によりわかった。今後は、軟骨分化関連遺伝子である *Col2a1*, *Sox9*, *ACAN* などの発現を調べ、mRNA レベルで分化の進行度を評価し、3D スキャフォールドの内部においての軟骨細胞の分化のレベルを調べるために、3D スキャフォールド中の軟骨組織の切片を作製し、染色を行い、評価する予定である。

Evaluation of chondrocyte culture and differentiation on polylactic acid scaffold material

Muquan Qiu[1], Yuki Kawamura[1] , Ayaka Hiroe[2] , Seiichi Taguchi[2] , Yoh-ichi Tagawa[1]
[1]Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
[2]Department of Molecular Biology, Department of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture
Tel: +81-45-924-6355, Fax: +81-45-924-5809, E-mail: qiu.m.aa@m.titech.ac.jp

1P-064

細胞浸潤性を向上する疎水化ゼラチンゲルの創製

[1]筑波大学大学院数理物質科学研究科，[2]物質・材料研究機構機能性材料研究拠点バイオ機能分野
○水野　陽介[1]，田口　哲志[1,2]

【緒言】　外傷・疾病等により機能が失われた臓器を回復させるために、細胞・組織を移植することで機能を再生させる手法が提案されている。移植細胞の生存性・生着率を高めるために、材料に求められる特性の一つとして、材料への細胞浸潤性が求められている。

そこで、本研究では、低温流動性の高いタラ由来ゼラチン（Alaska pollock-derived gelatin, ApGltn）をヘキシル基により疎水化したヘキシル化タラゼラチン（C6-ApGltn）を合成した。C6-ApGltn は医療応用実績のあるポリエチレングリコール系架橋剤（4S-PEG）と組み合わせることで in situ ゲル化可能な C6-ApGltn ハイドロゲルを調製し、ハイドロゲル内部への細胞浸潤性に対する疎水基の効果を検討した。

【実験】C6-ApGltn は ApGltn に含まれるリジン残基（アミノ基）に対してヘキサナールを反応させ Schiff 塩基とした後に 2-ピコリンボランにより還元することで合成した(**Fig. 1A**)。ヘキシル基の導入率は 2,4,6-トリニトロベンゼンを用いた方法（TNBS 法）により定量し、また ^{1}H 核磁気共鳴分光法（^{1}H-NMR）およびフーリエ変換赤外分光法（FT-IR）によりヘキシル基の定性分析を行った。C6-ApGltn は 4S-PEG 架橋剤と混合することでゲル化させた。得られた C6-ApGltn ハイドロゲルを用いて、動的粘弾性、膨潤度、水接触角評価、ピレンによるゲル内部の疎水性評価を行った。さらに、細胞を用いた in vitro およびラットを用いた in vivo 細胞浸潤性の評価を行った。

【結果と考察】C6-ApGltn ハイドロゲルは未修飾ゼラチン(Org-ApGltn)ハイドロゲルと比較して弾性率、膨潤度の有意な差は認められなかった。一方、in vitro および in vivo 細胞浸潤性評価では、C6-ApGltn ハイドロゲルは Org-ApGltn と比較して細胞浸潤性が有意に増加した(**Fig. 1B**)。ピレンを用いた C6-ApGltn ハイドロゲルの疎水性評価では、Org-ApGltn ハイドロゲルと比較して蛍光強度が増加したため、疎水的な部分が存在することが明らかとなった。さらに、水接触角測定では Org-ApGltn ハイドロゲルと比較して C6-ApGltn ハイドロゲル内部への水の浸透速度が有意に高かった。以上の結果から、C6-ApGltn ハイドロゲルは導入したヘキシル基同士の疎水性相互作用により架橋構造の不均一化が起きたために、細胞浸潤性が向上したと考えられた。

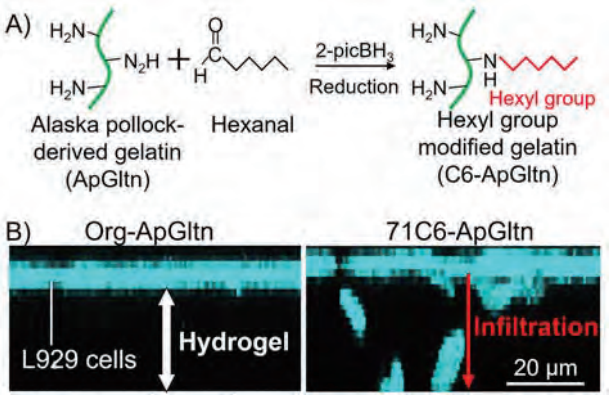


Fig. 1. (A) Synthesis of C6-ApGltn by reacting primary amine group of ApGltn and hexanal followed by hydride reduction. (B) Evaluation of cell migration into C6-ApGltn hydrogel observed by confocal microscope.

【結論】C6-ApGltn ハイドロゲルは、導入されたヘキシル基同士の分子間疎水性相互作用により架橋構造の不均一化を誘導し、細胞浸潤性を向上させた。調製したゲルは in situ 硬化型のゲルであるため、インジェクタビリティ、機械的強度、細胞浸潤性を兼ね備えたハイドロゲルの調製が可能であると考えられた。

Development of cell migration inducible hydrogel composed of hydrophobically-modified fish gelatin

Yosuke Mizuno[1] and Tetsushi Taguchi[1,2]
[1] Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba
[2] Biomaterials Field, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science
Tel: +81-29-860-4498, E-mail: TAGUCHI.Tetsushi@nims.go.jp

1P-065

骨組織形成を指向したタンパク質ハイドロゲルに関する研究

東京工業大学生命理工学院
○山本　遼太郎，眞下　泰正，三重　正和，小畠　英理

【緒言】組織工学において、適切な足場材料の設計は不可欠である。これまでに当研究室では、細胞の 3 次元組織形成を実現するための足場材料として、温度に応答してハイドロゲル化する融合タンパク質(AVGVP)42-D88-CL（coiled-coil unit bound ELP; O-CUBE）を開発した。この融合タンパク質は、温度に応答して疎水性相互作用により凝集するエラスチン由来の疎水性ポリペプチド(AVGVP)の 42 回くり返し配列、ELP の過剰な凝集を防ぐポリアスパラギン酸 D88、融合タンパク質同士の架橋点となるアンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL（CL）からなり、エラスチン由来の(AVGVP)42 のはたらきにより温度応答的にハイドロゲル化する。このハイドロゲルは、生体適合性や生分解性に優れており、タンパク質濃度を調整することによりゲルの硬さを制御することができるため、組織工学の足場材料として使用することができる。さらに、この足場材料設計を基盤として、このタンパク質に細胞接着能を付与するために骨シアロタンパク質（BSP）由来の RGD 配列を挿入した AVGVP42-D88-bRGD-CL（bRGD-CUBE；B-CUBE）を開発した。本研究では、この B-CUBE を 3 次元組織形成の足場材料としてヒト間葉系幹細胞（hMSC）の骨芽細胞分化誘導による骨組織の形成を目的とした。

【実験】CUBE タンパク質は大腸菌発現系によって発現させ、エラスチン由来ポリペプチド特有の精製方法である Inverse Transition Cycling（ITC）法により精製した。精製したタンパク質を PBS で希釈し、温度応答的にハイドロゲル化するタンパク質溶液を得た。相転移温度の測定を行い、加温によるゲル化及び冷却によるゾル化の確認を行った。また、CUBE タンパク質をコートしたプレート上で、hMSC の細胞 接着や増殖能を評価した後、骨分化誘導培地を用いることで 2 次元での hMSC の骨芽細胞分化誘導を行い、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を測定した。3 次元培養において骨芽細胞分化誘導を行う際には、B-CUBE ハイドロゲル内に hMSC を包埋させて滴下することによりドロップレットを形成させて、37℃に加温することでハイドロゲルを作製した。ここに骨芽細胞分化誘導培地を加えることで、細胞の分化を誘導した。

【結果と考察】精製したタンパク質溶液は 30℃以上に加温することよりハイドロゲル化することを確認した。このタンパク質ハイドロゲルは、相転移温度測定の結果から温度応答性を有することが示された。また、O-CUBE と B-CUBE をプレートにコートした上で hMSC を培養したところ、RGD 配列が存在する B-CUBE 上でのみ細胞の接着があった。骨分化誘導培地を用いた B-CUBE 上での hMSC の骨分化誘導の実験では、培養から 12 日後に骨芽細胞分化マーカーである ALP 活性を見るために ALP の基質である BCIP-NBT 溶液を用いて染色を行った。骨分化誘導培地で培養した細胞が染色されたことから、B-CUBE 上での骨芽細胞への分化が可能であることが示された。更に、B-CUBE ハイドロゲル内で hMSC の 3 次元培養が可能であることがわかり、骨芽細胞分化誘導の実験では 2 次元の場合と同様の ALP 活性測定により骨芽細胞分化を確認することができた。

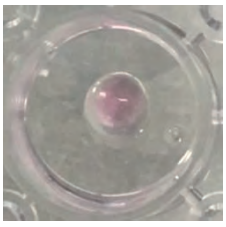


Figure 1. B-CUBE hydrogel droplet

Research of protein hydrogel for bone tissue formation

Ryotaro Yamamoto, Yasumasa Mashimo, Masayasu Mie, Eiry Kobatake
School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
Tel: 045-924-5761, Fax: 045-924-5779, E-mail: yamamoto.r.ah@m.titech.ac.jp

1P-066

ヒアルロン酸を用いた網目状ナノファイバーシートの創製と非伸展接着細胞培養への応用

[1] 東京薬科大学大学院生命科学研究科, [2] 東京薬科大学生命科学部
○川西　隆仁[1]，久保田　萌[2], 青木　元秀[1]，熊田英峰[1]，梅村　知也[1], 内田　達也[1]

【緒言】多くの接着培養系において、細胞はフラスコやシャーレ等の硬い容器で培養される。しかし、未分化性を有する多能性幹細胞はフラスコの硬さ及び基質-インテグリン相互作用により、必要以上に伸展してしまうため未分化性を維持できなくなる。上記の問題を解決すべく、伸展接着を抑えた「ソフトな細胞足場」の開発が喫緊の課題と言える。そこで本研究グループでは細胞外マトリックスの主要成分であるヒアルロン酸に着目した。ヒアルロン酸は保水性や粘弾性としての機能だけでなく、細胞表面の CD44 と相互作用することで細胞増殖や未分化性維持に寄与している。しかしながらヒアルロン酸は吸水性に優れている為、ナノファイバーの構築及び培養液中の形態保持は困難である。発表では、エレクトロスピニング法によるナノファイバー構築の至適条件及び、*in situ* 架橋法によるヒアルロン酸ナノファイバーシート(HNFS)の耐水化について報告する。また、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を用いて評価した結果も併せて報告する。

【実験】ヒアルロン酸(MW < 1,000k)を化学修飾した後、PEO、milliQ 水、N,N ジメチルホルムアミドを混合し、ヒアルロン酸ポリマー溶液を調整した。作製した溶液をエレクトロスピニング法にてヒアルロン酸ナノファイバーシート(HA-NF)の作製を試みた。HA-NF 作製時における温度、湿度による影響を走査型電子顕微鏡(SEM)にて評価した。また、作製した HA-NF をカルボジイミド系とエポキシ基を有する架橋剤をそれぞれエタノール溶媒中で *in situ* 架橋した。その後、エタノール、milliQ 水及び液体培地で逐次洗浄した。次いで、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を用いて HA-NF 上で 37°C、5%CO_2 の環境で培養した後、SEM による形態学的評価を行った。

【結果と考察】ヒアルロン酸ナノファイバーシート(HA-NF)構築において、湿度を低く保つことにより、Fig. 1(A)に示す様な間隙を有するナノファイバーシートが得られた。この結果より再現性の高い基材構築の条件が同定された。また、Fig. 1(B)に示す通り in situ 架橋法によりナノファイバーの形態が培養液中でも保持されていることが示された。培養液中の HA-NF は繊維の緩みを確認でき、細胞が潜り込める柔軟性が示唆された。さらに、架橋後の HA-NF はヒアルロニダーゼによる分解も確認された。次いで、NHDF を用いた実験により細胞の形態が大きく異なる結果が得られた。カバーガラス上に培養した NHDF は「面」で接着し、細胞核が見える程大きく伸展しているのに対して、ヒアルロン酸ナノファイバーシート(HA-NF)では点や線で接着し、球状形態を維持した状態で繊維の中に潜り込む様子が存在していることが示された。カバーガラス上の NHDF では見られない顆粒物質の存在や細胞がヒアルロン酸ナノファイバーを取り込んでいる様子も確認された。以上の結果より、開発したヒアルロン酸ナノファイバーシートは細胞表面の CD44 とヒアルロン酸の相互作用が機能しながら、細胞伸展を抑えられる基材であると示唆された。細胞伸展を抑えたまま培養できる新規の培養基材として再生医療に貢献できると期待される。

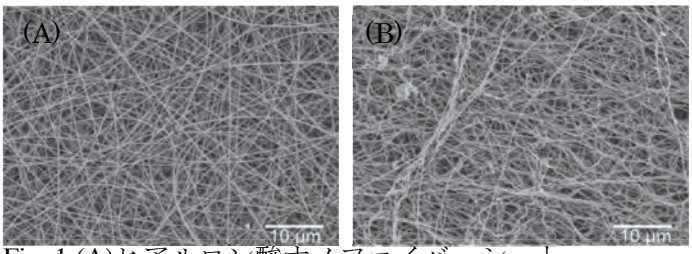


Fig. 1 (A)ヒアルロン酸ナノファイバーシート,
(B)培養液中のヒアルロン酸ナノファイバーシート

Development of nanofiber networks based on hyaluronan which enable 3D-cell culture suppressing cell spreading

Ryuto Kawanishi[1], Megumi Kubota[1], Motohide Aoki[1], Hidetoshi Kumata[1], Tomonari Umemura[1],Tatsuya Uchida[1],
[1]Graduate School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
[2]Department of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Tel: +81-42-676-5093, Fax: +81-42-676-6354, E-mail: uchi@toyaku.ac.jp

1P-067

鎖長の異なる低分子量ポリリン酸の金属イオンによるゲル形成能と生体適合性評価

[1] 東京大学大学院工学系研究科，[2] 東京大学大学院医学系研究科
○大川　将志[1]，太田　誠一[2]，伊藤　大知[1,2]

【緒言】 近年、ポリリン酸(PolyP)は血小板から凝固過程[1]において放出され止血に寄与し、その効果は鎖長に寄与することが報告された。このため止血材[2]や再生医療の足場材料などのバイオマテリアルとしての利用が期待される。しかしながら、その生理機能は十分に明らかではない。PolyP の金属イオンとの相互作用や炎症反応への寄与が報告されているが、鎖長 100 以下の低分子 PolyP において、分子量依存性を検討した例は報告されていない。そこで、本研究では重合度 100 以下の PolyP を用いて、ゲル形成能および炎症に対する鎖長の寄与を検討した。

【実験】 鎖長の異なる PolyP (D.P.=14, 40, 100)と Ca イオンとの混合によるゲル化特性を評価した。PolyP 水溶液(0.0625-2.0 M :モノリン酸換算)と塩化カルシウム($CaCl_2$)溶液(0.0625-2.0 M)を 1 : 1 で混合し、その後ゲル化を評価した。また、対イオンの影響を調べるため同様の実験を硝酸カルシウム($CaNO_3$)溶液を用いて行った。続いて、鎖長の異なる PolyP の生体適合性評価のために RAW264.7(マウス腹腔マクロファージ), HUVEC(ヒト血管内皮細胞), MeT5A(ヒト中皮細胞), NIH3T3(マウス線維芽細胞)に対して濃度の異なる PolyP(0.0001-1 M)を暴露後 12 h 後に WST-8 Assay を行い細胞毒性を評価をした。さらに、炎症に対する PolyP の影響をを評価するため、ELISA により PolyP 暴露後 12 h に RAW264.7, HUVEC, MeT5A の TNF-α産生量を測定した。

【結果と考察】 重合度が 14, 40, 100 の 3 種類の PolyP と $CaCl_2$, $CaNO_3$ を混合しゲルを形成を認めた(Fig.1)。 $CaCl_2$, $CaNO_3$ いずれの場合も鎖長によらず、ゲル化の閾値濃度は変わらなかった。

また、細胞生存率評価の結果では、４種すべての細胞において 12 h 時点で濃度 0.1 M 以上ではコントロール群と比較して、50%以下の生存率を示していた一方で、0.01 M 以下の濃度では 48 h 時点でも 80%以上の高い生存率を示していた。細胞毒性評価では PolyP の鎖長の違いの影響は見られなかった(Fig.2)。

一方で ELISA による RAW264.7 の TNF-α産生量測定結果では、PolyP の鎖長が長くなるにつれ TNF-α産生量が増加した。また、鎖長 14 の PolyP の TNF-α産生量はコントロール群と比較して有意な差はなかった(Fig.2)。

以上のように低分子量 PolyP は鎖長により大きな性質の違いを示すことが示唆された。

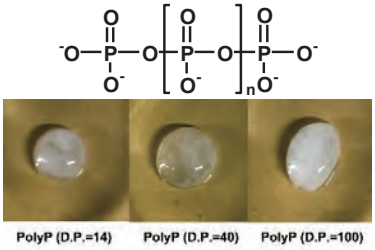


Fig.1 PolyP の化学構造（上）及び PolyP と $CaCl_2$ の混合によるゲル形成（下）

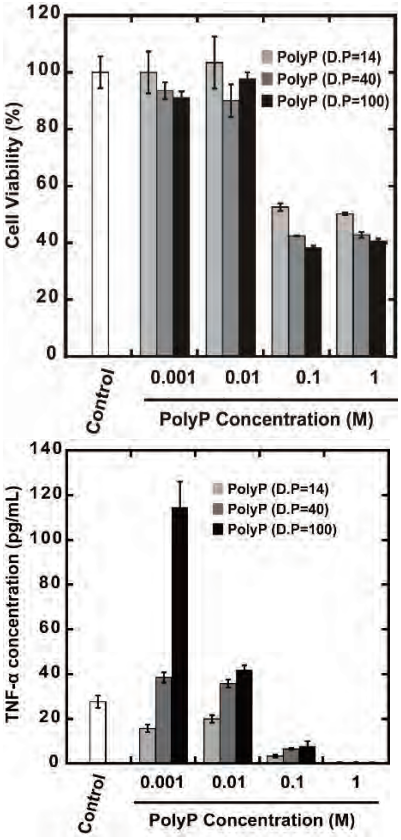


Fig.2 RAW264.7 の TNF-α産生量（上）と細胞生存率（下）

【謝辞】PolyP を提供していただいたリジェンティス株式会社に感謝致します。

【参考文献】1) J.H. Morrissey *et al, Blood, **116**, 4353–4359 (2010)*
2)M.Sakoda , S.Ohta, T.Ito *et al, Biomacromolecules*(in press)*(2018)*

Effect of chain length of polyphosphate on its hydrogel formation with metal ions and biocompatibility

Masashi Okawa[1], Seiichi Ohta[2], Taichi Ito [1,2]
[1]School of Engineering, The University of Tokyo [2]School of Medicine, The University of Tokyo
Tel: +81-3-5841-1696, Fax: +81-3-5841-1697, E-mail: o_masa@chemsys.t.u-tokyo.ac.jp

1P-068

Preparation of bifunctional scaffolds for photothermal therapy and tissue regeneration

○Xiuhui Wang[1,2], Naoki Kawazoe[1] and Guoping Chen[1,2]
1. Research Center for Functional Material, National Institute for Materials Science (NIMS)
2. Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

【Introduction】Breast cancer has become a major threat to female health, whose morbidity and mortality are increasing worldwide. Although surgical resection, chemotherapy, radiotherapy and their combination have been widely applied in clinic, these conventional approaches are reported to sometimes induce adverse effects such as tumor-initiated breast defects, drug resistance and tumor recurrence. To address these issues, it is desired to design and develop a bifunctional scaffold for realizing tumor ablation as a safe and effective method and simultaneously achieving breast reconstruction using bioactive scaffolds. Here, we prepared a bifunctional scaffold for photothermal therapy of breast tumor and adipose tissue regeneration. To do this, highly porous gelatin scaffolds incorporated with gold nanorods (AuNRs) were prepared by a freeze-drying method using ice particulates as a porogen. The AuNR-gelatin porous scaffolds exhibited not only effective photothermal ablation of breast tumor cells under near infrared (NIR) irradiation but also promotive effect on adipose tissue regeneration.

【Materials & Methods】The AuNR-gelatin porous scaffolds were obtained by freeze-drying the mixture of AuNRs, gelatin solution and ice particulates. Briefly, AuNRs were synthesized by a seed-mediated growth method and were characterized by TEM and visible-near infrared absorption spectroscopy. Ice particulates were prepared by spraying ultrapure water into liquid nitrogen and then mixed with gelatin solution containing different concentration of AuNRs. The constructs were frozen in a silicone mold, freeze-dried and cross-linked to obtain AuNR-gelatin composite porous scaffolds. The composite scaffolds were seeded with breast tumor cells (MDA-MB231-Luc) and cell ablation was conducted by NIR laser irradiation (808 nm) *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, to evaluate the effect of the scaffolds on adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs), hMSCs were cultured in the AuNR-gelatin porous scaffolds with adipogenic medium. After 2-week culture, Oil red O staining and adipogenic gene expression analysis by real time RT-PCR were performed.

【Results & Discussion】 The AuNRs had a rod-like shape with a dimension of 66.1 ± 2.3 nm × 13.6 ± 2.5 nm (Fig. 1A). Visible-near infrared absorption spectrum showed that the AuNRs had a strong absorption peak in near infrared region (Fig. 1B), which is beneficial for photothermal therapy. SEM observation showed that the AuNR-gelatin composite scaffolds had spherical pores with good interconnectivity and that the AuNRs were homogeneously dispersed in the composite scaffolds without aggregation (Fig. 1C). The AuNR-gelatin scaffolds had a high photothermal ablation efficiency of MDA-MB231-Luc *in vitro* and *in vivo*. In addition, the adipogenic differentiation of hMSCs in AuNR-gelatin scaffolds was confirmed by the formation of lipid vacuoles and the real time RT-PCR results of adipogenesis-related marker genes. In conclusion, the AuNR-gelatin scaffolds showed a high potential for simultaneous photothermal ablation of breast tumor and breast regeneration.

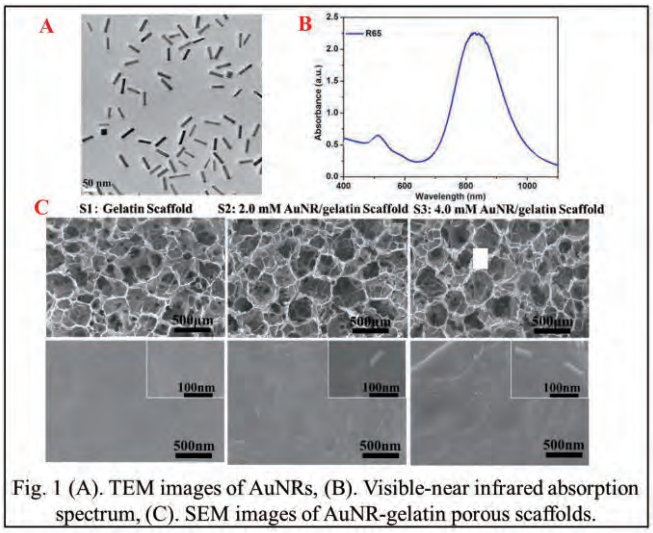


Fig. 1 (A). TEM images of AuNRs, (B). Visible-near infrared absorption spectrum, (C). SEM images of AuNR-gelatin porous scaffolds.

1P-069

マイクロ流路チップを用いた外側血液網膜関門モデルの開発

[1] 東北大学大学院工学研究科、 [2] 東北大学大学院医学系研究科
○伊藤竣 [1]、Li-Jiun Chen[1]、永井展祐 [2]、西澤松彦 [1]、阿部俊明 [2]、梶弘和 [1]

【緒言】
近年、生体の臓器や組織をマイクロ流路チップ内に再現する臓器チップ（Organ-on-a-Chip）の研究がさかんに行われており、病態研究や薬剤スクリーニングに大きな期待が持たれている。これまでに多様な臓器チップが開発されてきたが、網膜組織を対象とした臓器チップの報告例はほとんどない。外側網膜は網膜色素上皮細胞（RPE）層とブルッフ膜、毛細血管網である脈絡膜から成り、RPE 層を実体とする外側網膜血液関門（oBRB）が脈絡膜と網膜間の物質移動を制御し、網膜の恒常性を維持している。網膜疾患においては脈絡膜からの病的新生血管がこの oBRB を障害し、視力低下につながる。そこで、本研究ではマイクロ流路チップ内に RPE、ブルッフ膜、脈絡膜から成る外側網膜の構造を再現し、oBRB における病態を模擬可能な網膜疾患モデルの開発に取り組んだ。
【実験】
使用したマイクロ流路チップは 2 層構造を持ち、上下の流路間を多孔質膜で仕切られている（図 1）。下層流路は複数の流路間にマイクロポストアレイを形成しており、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、ヒト肺線維芽細胞（NHLF）を懸濁させたフィブリノーゲンとトロンビンの混合溶液を中央と両脇のチャンネルにそれぞれ注入し、ゲル化させた後、培養液で満たした。インキュベータで培養を続け、血管が形成した後、上層流路に RPE を培養することにより外側網膜組織を構築した。上層にて RPE 層、下層にて脈絡膜、多孔質膜でブルッフ膜を模擬している。マイクロ流路チップはフォトリソグラフィによって作製した型にポリジメチルシロキサン（PDMS）を流し固め、作製した。
【結果と考察】
HUVEC は NHLF との共培養において NHLF の成長因子が作用し、3 次元血管構造を形成することが観察された。下層流路において血管形成後、上層流路に RPE の懸濁液を導入したところ、3 次元血管系上方に RPE 単層を培養でき、マイクロ流路チップ内に外側網膜培養モデルを形成できた（図 2）。また、作製したモデルに対して蛍光色素等を流し、透過性試験を行ったところ、RPE 層の存在によって透過率の減少が見られ、血液網膜関門としての機能が示唆された。今後は細胞周辺環境を制御（高血糖、低酸素状態）することで網膜疾患における病的新生血管を誘導し、外側網膜の病態モデルとして評価を行う予定である。

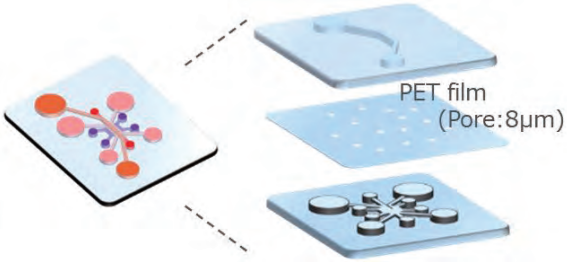


図 1　2 層流路模式図

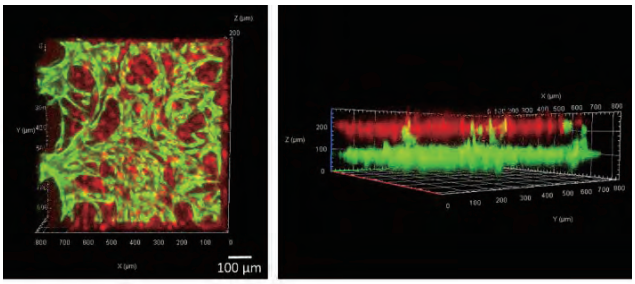


図 2　外側網膜モデル（左 : 上面、右 : 断面図　赤色が RPE、緑色が HUVEC）

Microfluidic cell culture model of the outer blood retina barrier
Shun Ito[1], Li-Jiun Chen[1], Nobuhiro Nagai[2], Toshiaki Abe[2], Matsuhiko Nishizawa[1], Hirokazu Kaji[1]
[1]Department of Finemechanics, Graduate School of engineering, Tohoku University
[2]Division of Clinical Cell Therapy, Graduate School of Medicine, Tohoku University
Tel: +81-22-795-3586, Fax: +81-22-795-3586, E-mail: ito@biomems.mech.tohoku.ac.jp

1P-070

Establishment of Disease Model Using Nano-patterned Scaffold

○ Chia Jung Chang (Presenter) [1, 2], and Akiyoshi Taniguchi[1, 2]

1. Cellular Functional Nanobiomaterials Group, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan
2. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.

Introduction: Biomaterials topography provided a powerful means to study the influence of extracellular matrix (ECM) topography on cell behavior. Cells are known to be surrounded by nanoscale topography in their natural extracellular environment. Mimicking the natural and abnormal environment of the cells by nanoscale interface is critical to understand how cells modulate their cellular function and activities. The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* effect of surface topographic features that mimic the abnormal renal mesangial matrix on cell behavior. Mesangial cells are specialized cells in the kidney and play an important role in generating and controlling the turnover of the mesangial matrix which provides structural support for integrity of the glomerular capillary loops and mesangial matrix homeostasis.

Method & results: To mimic the physical cues provided by the ECM, amorphous TiO_2 nanogratings with specific dimensional and geometrical characteristics (nanogratings 80 nm wide and 80 nm apart) were fabricated. An immortalized mouse mesangial cell line (MES-13) was cultured on the various nanopattern (cross-link, fibril-like and unpatterned) surfaces and its' morphological and functional changes induced by topographical interface were evaluated, including cellular alignment and the expression of different ECM proteins. The mesangial cells cultured on the fibril-like surface adapted with an elongated morphology. In contrast, cells cultured on the cross-link and unpatterned surfaces showed no elongation and limited spreading. Additionally, immunocytochemistry showed lower levels of laminin-1 and type IV collagen synthesized and higher levels of type I collagen and fibronectin produced in cells cultured on fibril-like surface when compared to those on cross-link and unpatterned surfaces. It is well known that laminin and type IV collagen are the major ECM components in mesangial matrix, whereas novel synthesized type I collagen and fibronectin were detectable in abnormal situation such diabetic nephropathy.

Conclusions: Our data showed the fibril-like nanopattern surface influenced cell morphology changes and ECM protein synthesis. This study evaluates the potential for establishing a model mimicking diseased mesangial matrix to better understand of the interactions between cells and diseased environment.

Establishment of Disease Model Using Nano-patterned Scaffold

○ Chia Jung Chang (Presenter) [1, 2] and Akiyoshi Taniguchi[1, 2]

1.Cellular Functional Nanobiomaterials Group, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan
2.Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.
TANIGUCHI.Akiyoshi@nims.go.jp, CHANG.Chiajung@nims.go.jp

1P-071

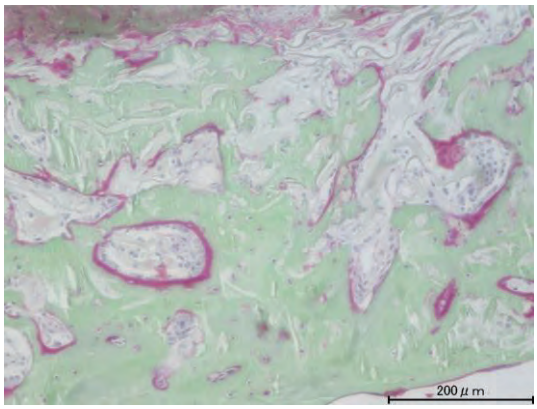
異なる組成のエピガロカテキンガレート結合ゼラチンは再生骨の骨質を変化させる

[1] 大阪歯科大学歯科矯正学講座，[2] 大阪歯科大学中央歯学研究所，[3] 東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野，[4] 京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル学専攻
○原瑛紀 [1]，本田義知 [2]，鈴木治 [3]，田中知成 [4]，松本尚之 [1]

【緒言】
歯科・整形外科領域において優れた骨補填材が求められ、積極的な開発が進められている。緑茶由来の Epigallocatechin gallate（EGCG）は抗炎症等の薬理効果を持つものの、生体内での骨再生に関しての効果には更なる解明の余地を残す。 近年演者らは、EGCG とゼラチンを化学的に結合させた EGCG 結合ゼラチン（EGCG-GS）を開発するとともに、それに真空加熱処理を施した vhEGCG-GS が優れた骨再生能を示すことを明らかにした。しかしながら、得られた再生骨の骨質についての解明には至っていない。本研究では、EGCG とゼラチンの配合比を変化させた数種類の vhEGCG-GS と、ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて、再生骨の骨質の解明を試みた。

【実験】
ゼラチンには豚皮膚由来の TypeA ゼラチンを、EGCG は緑茶から抽出された EGCG を用いた。両材料の配合比を変化させた EGCG-GS を水中にて合成し、その後凍結乾燥後、150 度 24 時間真空加熱を行い vhEGCG-GS を作製した。合成時、EGCG が 0.0007wt%に対して、ゼラチンを 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0 wt%と変化させ 5 種類の vhEGCG-GS を合成した。vhEGCG-GS の形状及び表面性状は、走査型電子顕微鏡にて確認した。骨形成能評価には、8 週齢の雄性 SD ラットの頭蓋冠に直径 9.0 mm の骨欠損を形成し、各試料を埋入して評価した。埋入 4 週後に、頭蓋冠を摘出しμCT による骨形態計測と、ヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色、v.goldner 染色（下図）による組織学的評価を行った。統計学的評価には、一元配置分散分析と Tukey 法を用いた。

【結果と考察】
0.01wt%ゼラチンで合成した vhEGCG-GS では、スポンジ状の担体が作製できなかった。0.1wt% ゼラチンで合成した vhEGCG-GS では、顕著な骨形成促進が認められなかった。他の vhEGCG-GS では、含まれるゼラチン量の増加に比例し、新生骨形成量が増加する一方、骨密度が低下した。v.goldner 染色画像を確認すると、未成熟コラーゲン（類骨）の比率はゼラチン量が多い vhEGCG-GS ほど高いことが明らかとなった。いずれの試料も欠損内に埋入した EGCG 量が一定であったことを考慮すると、EGCG の薬理効果を発揮するためには、一定量のゼラチンが必須であることが明らかとなった。これは、ゼラチンが骨欠損中の多能性前駆細胞や骨芽細胞に対する足場やスペースメーキングとして使われたためと推察される。また、ゼラチン量の増加が、類骨の比率を高めたのは、足場が増え形成中の骨組織が増加したためと推察された。以上より、vhEGCG-GS に含まれるゼラチン用量の変化は、再生骨の骨質に影響を与える事が示唆された。



Epigallocatechin gallate-modified gelatins with different compositions alter the quality of regenerated bones

Eiki HARA[1], Yoshitomo HONDA[2], Osamu SUZUKI[3], Tomonari TANAKA[4], Naoyuki MATSUMOTO[1]
[1]Department of Orthodontics, Osaka Dental University, [2]Institute of Dental Research, Osaka Dental University, [3]Craniofacial Function Engineering, Tohoku University Graduate School of Dentistry, [4]Graduate School of Science and Technology Craniofacial Function Engineering
Tel: +81-6-6910-1514, Fax: +81-6-6910-1514, E-mail: hara-e@cc.osaka-dent.ac.jp

1P-072

細胞骨格タンパク質と相互作用するN-アセチルグルコサミン修飾絹フィブロインの作製

[1] 農業・食品産業技術総合研究機構　生物機能利用研究部門，[2] 農業・食品産業技術総合研究機構高度解析センター，[3] 九州大学先導物質化学研究所
○後藤　洋子[1]，山崎　俊正[2]，伊勢　裕彦[3]

【緒言】絹フィブロイン（SF）は蚕が生産する繊維タンパク質で人獣共通感染症のリスクがなく、フィルム・スポンジ・不織布などに成形加工できることから、組織再生用の細胞足場材料への応用が検討されている。一方、血管内皮細胞などの間葉系細胞においては細胞骨格タンパク質のビメンチンやデスミンが細胞表面に出現し、細胞が細胞骨格タンパク質を介してN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）糖鎖を認識して結合することが明らかにされている[1]。本研究では簡便な合成化学的手法によって間葉系細胞の接着性が高いSFを作出することを目的とし、これまでにGlcNAcの二糖N.N'-ジアセチルキトビオース（GlcNAc2）を化学修飾したSFの作製を行い、GlcNAc2修飾SFにおいて血管内皮細胞の接着性が向上することを明らかにした[2]。しかしながら、GlcNAc2は高価であり、またアクリル酸を主鎖として単糖のGlcNAcが結合した合成高分子が細胞骨格タンパク質を発現する細胞と強い相互作用を示すことが見出されたことから[3]、今回入手容易な単糖GlcNAcを修飾したSF（SF-GlcNAc）の作出を行った。そして、SFへのGlcNAcの導入と、導入GlcNAcのアノマー位の結合様式を確認するため、SF-GlcNAcとレクチンとの認識相互作用の評価を行った。また、SF-GlcNAcと細胞骨格タンパク質との相互作用についても検討を行った。

【実験】SF-GlcNAcの作製は、これまでと同様アルカリ条件下塩化シアヌルとの反応でトリアジニル誘導体としたGlcNAcによる可溶化SFのアミノ酸残基の化学修飾で行った（Fig. 1）。^{1}H-NMRスペクトルは重水中でBruker Avance 750を用いて測定した。レクチンとの認識相互作用の評価として、SF-GlcNAcあるいはSFをコートしたマイクロプレートのウエルへのスクシニル化小麦胚芽レクチン（sWGA）の吸着量の比較を、ビオチン標識sWGA及びペルオキシダーゼ標識アビジンを用いたアビジン・ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法により行った。また、SF-GlcNAcあるいはSFのコートウエルに大腸菌より作製したデスミンを添加し、その後抗デスミン抗体を用いたELISA法を用いて、デスミンとの相互作用の評価を行った。

【結果と考察】SF-GlcNAcの^{1}H-NMRスペクトルではN-アセチル基のメチル水素に由来する複数のピークが現れてGlcNAcの修飾導入が確認されるとともに、混合比既知のSFとGlcNAcの混合物のスペクトルにおけるN-アセチル基のメチル水素とアラニン残基のβ-メチル水素のピーク積分値の比較から、SF-GlcNAc中の糖含有量を9wt%と推定した。SF-GlcNAcコートマイクロプレートにおけるsWGAの吸着量を調べたところ、SFコートマイクロプレートに比べ著しい増加が認められた。この結果は、SFに導入されたGlcNAcのアノマー性水酸基は塩化シアヌルとの間に主にβ結合を形成しているため、sWGAによって特異的に認識されたことを示唆する。そして、SF-GlcNAcはSFよりもデスミンと強い相互作用を示したことから、SF-GlcNAcは間葉系細胞の足場材料として有効である可能性がある。

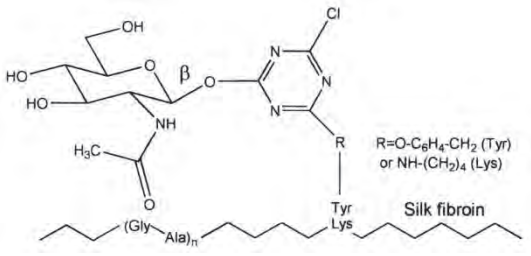


Fig. 1 Chemical structure of SF-GlcNAc.

[1] Ise H. et al., *Glycobiology* **20,** 843 (2010). [2] 後藤ら、第39回日本バイオマテリアル学会大会予稿集，226 (2017). [3] Ise H. et al., *Genes to Cells* **22,** 900 (2017).

Preparation of N-acetylglucosamine-modified silk fibroin that interacts with cytoskeletal proteins

Yohko Gotoh[1], Toshimasa Yamazaki[2] and Hirohiko Ise[3]
[1]Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), [2]Advanced Analysis Center, NARO, [3]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University
Tel: +81-29-838-6160, Fax: +81-29-838-6028, E-mail: gotohy@affrc.go.jp

1P-073

３次元培養のための磁性ナノ粒子含有ハイドロゲルの作製

[1] 東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻
○徳田真由美[1]、森本展行[1]、山本雅哉[1]

【緒言】
通常、細胞はシャーレ上などの 2 次元で培養されるが、体内では多くの細胞が、3 次元の細胞外環境に存在している。このため、2 次元培養では細胞が本来もつ機能の発現が必ずしも期待できないという問題がある。近年、再生医療や創薬研究において、体内の細胞外環境を再現する技術として 3 次元培養法が注目されている。これまで、細胞シートや細胞包理ハイドロゲル、細胞凝集体など、多くの 3 次元培養法が研究されてきたが、手技の複雑さや少ない酸素供給による細胞の死滅、細胞をハイドロゲルから取り出すことが難しい点など、多くの問題点がある。本研究では、3 次元培養法として、ハイドロゲルで細胞を挟み込むサンドイッチ培養法に着目した。サンドイッチ培養法は、容易に 3 次元培養を可能とするが、サンドイッチ状態を維持する技術の開発が必要である。本研究では、磁力によりサンドイッチ状態を維持する方法として、生体適合性をもつ磁性ナノ粒子を含有したハイドロゲルを作製した。

【実験】
牛骨ゼラチン（等電点 5.0、分子量 100,000、新田ゼラチン社製）、塩化鉄（Ⅱ）および塩化鉄（Ⅲ）を用いて、共沈法によりゼラチン被覆磁性ナノ粒子を作製した。得られた磁性ナノ粒子は、動的光散乱（DLS）を用いて評価した。次に、磁性ナノ粒子を I 型コラーゲン溶液（5 mg/mL）に分散後、ゲル化させることにより、磁性ナノ粒子含有コラーゲンハイドロゲルを作製した。同様に、磁性ナノ粒子を含有したスルホベタインポリマー（PDMAPS）からなる PDMAPS ハイドロゲルを作製した。得られた PDMAPS ハイドロゲルの表面に対して、I 型コラーゲンを固定化することにより、細胞接着性を付与した。得られた磁性ナノ粒子含有ハイドロゲルとネオジム磁石とを用いて、イヌの腎尿細管上皮細胞（MDCK 細胞）をサンドイッチ培養法により 3 次元培養した。

【結果と考察】
DLS 測定の結果から、共沈法により平均粒径 300 nm のゼラチン被覆磁性ナノ粒子を得ることができた。この磁性ナノ粒子含有コラーゲンハイドロゲルを用いて、MDCK 細胞に対してサンドイッチ培養を行ったところ、MDCK 細胞が 2 次元培養とは異なる形状へ変化することがわかった（データ省略）。一方、培養に用いたネオジム磁石の強い磁力によって、コラーゲンハイドロゲルから磁性ナノ粒子が漏出することがわかった（データ省略）。この問題を解決するために、PDMAPS を化学架橋したハイドロゲル内に磁性ナノ粒子を含有させた。その結果、磁性ナノ粒子を PDMAPS ハイドロゲル内に留めることができた。さらに、 I 型コラーゲンを表面に固定化することにより、PDMAPS ハイドロゲル表面に対して、細胞接着性を付与することができた（図 1）。一方、PDMAPS ハイドロゲルの大きな浮力のため、磁力によるコントロールが容易でないこともわかった。このため、磁性ナノ粒子などに改善の余地があることが示唆された。



図 1　PDMAPS ハイドロゲルに接着した MDCK 細胞

Preparation of hydrogels containing magnetic nanoparticles for 3D culture

Mayumi Tokuda[1], Nobuyuki Morimoto[1], Masaya Yamamoto[1]
[1]Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University
Tel: +81-22-795-7313, Fax: +81-22-795-7313, E-mail:mayumi.tokuda.q8@dc.tohoku.ac.jp

1P-074

細胞コーティング技術を用いた三次元培養口腔歯肉・粘膜モデルの開発

[1]大阪大学大学院歯学研究科・顎口腔病因病態制御学講座・口腔外科学第二教室，[2]大阪大学大学院生命機能研究科・ビルディングブロックサイエンス共同研究講座
○西山　今日子[1]，岩井　聡一[1]，赤木　隆美[2]，明石　満[2]

【緒言】三次元培養皮膚モデルや口腔歯肉・粘膜モデルなどの表皮モデルは、医薬品や化粧品の効果判定・毒性試験、再生医療研究等に応用されている。皮膚と口腔では、同じ重層扁平上皮構造を示すが、皮膚表皮および口腔歯肉上皮では正角化、口腔粘膜上皮では錯角化を示し、角化挙動に大きな違いが見られる。そのため、これらの表皮構造を再現した三次元表皮モデルの開発が求められている。我々はこれまでに、交互浸漬法（Layer-by-layer: LbL 法）により細胞表面に細胞外マトリックス（ECM）成分からなる薄膜を形成することで、細胞を自在に三次元的に積層化できる技術を開発した。本細胞コーティング技術は、複数細胞の配置制御により血管・リンパ管網を含む多種多様な生体組織モデルの構築が可能である。そこで本研究では、LbL 法を用いて、ヒト口腔由来線維芽細胞と、2 種類のヒト口腔上皮細胞株用いて、生体類似の口腔歯肉・粘膜モデルの作製を試み、組織学的に評価した。また、多様な生理現象を評価できる三次元培養口腔モデルの開発を目指し、付属器として血管様構造を含む口腔歯肉・粘膜モデルの構築について検討した。

【実験】ヒト口腔線維芽細胞(HOMF)をフィブロネクチン(FN)およびゼラチン(G)の溶液に交互浸漬することで FN/G 薄膜でコーティングし、カルチャーインサートに播種することで、HOMF から真皮層モデルを構築した。その後、HOMF 層上にヒト口腔歯肉由来上皮細胞（HOMK）または口腔粘膜由来上皮細胞（HOK）を播種し、エアリフト(気-液界面)培養により HOMK および HOK の分化誘導を行った（Fig.1）。また、血管様構造を含む口腔モデルについては、真皮層構築時に、FN/G をコーティングした HOMF に、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を加え、同様に培養した。口腔モデルの組織学的評価は、Hematoxylin-Eosin(HE)染色、免疫組織染色を用いた。
【結果と考察】分化誘導 7 日後の組織切片の HE 染色像から、HOMF の積層体からなる真皮層の上に、上皮細胞の分化誘導に伴う階層構造および E-カドヘリン等の上皮細胞間接着が認められた。また、我々がこれまでに報告してきた培養皮膚モデルと比較し、培養口腔モデルを特徴付ける染色結果も得ることが出来た。さらに、上皮細胞として HOMK を用いたモデルは正角化を（Fig.2a）、HOK を用いたモデルでは錯角化を示し（Fig.2b）、上皮細胞の採取部位に一致した上皮分化誘導が可能であった。血管様構造を含む培養口腔モデルについては、共焦点顕微鏡・免疫組織染色にて、網状・管腔構造を観察することができ、真皮層に血管様構造を有していても、同様の上皮構造が構築できることが明らかとなった。血管様構造を含む本モデルは、移植材料・再生医療へのさらなる応用や、動物実験を代替する評価ツールとしての活用・試験法の開発の発展が期待される。

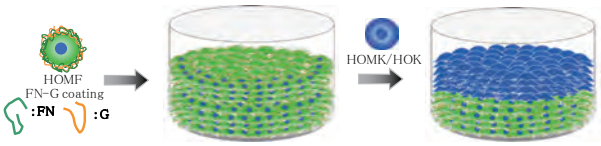


Fig.1. Construction of dermo-epidermal gingiva/mucosa equivalents using the layer-by-layer (LbL) cell coating technique.

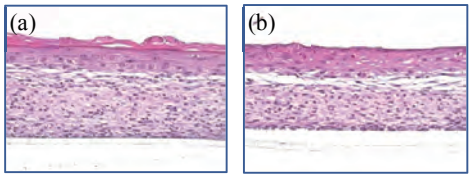


Fig.2. HE-stained images of 3D dermo-epidermal gingiva (a) and mucosa (b) equivalents consisting of HOMF and HOMK (a) or HOK (b).

Construction of three-dimensional (3D) dermo-epidermal gingiva/mucosa equivalents using cell coating technology

Kyoko Nishiyama[1], Soichi Iwai[1], Narikazu Uzawa [1], Takami Akagi[2], Mitsuru Akashi[2]
[1]Department Oral and Maxillofacial Surgery II, Graduate School of Dentistry, Osaka University, [2]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University
Tel: +81-6-6879-2941, Fax: +81-6-6879-2170, E-mail: k-nishiyama@dent.osaka-u.ac.jp

1P-075

人工多能性幹細胞から誘導される神経前駆細胞を効率よく増幅するための培養基材の設計

[1] 広島大学大学院医歯薬保健学研究科生体材料学，[2] 広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯科矯正学
○山内　優佳[1,2]，平田　伊佐雄[1]，谷本　幸太郎[2]，加藤　功一[1]

【緒言】
神経前駆細胞（NPC）は中枢神経を構成するニューロン、グリア細胞、オリゴデンドロサイトに分化することから、パーキンソン病や脊髄損傷などの中枢神経疾患の治療に有効であると期待されている。2018 年には、他人の iPS 細胞より得た NPC を用いて、パーキンソン病患者に対して細胞移植を行う臨床研究も開始される。また近年、iPS 細胞由来の NPC から末梢神経を再生させるための研究もみられ、口腔・顎顔面領域における末梢神経の再生治療にも期待が膨らむ。しかしながら、そのような細胞療法の普及には、iPS 細胞由来の神経幹細胞を短期間の間に大量にかつ高純度に得る方法が必要である。そこで、本研究では iPS 細胞から分化した NPC を効率的かつ高純度に得るための培養方法の確立を目的とした。とくに本研究では、上皮成長因子（EGF）が NPC の増殖を促進することに着目し、EGF を表面に固定した培養基材を設計した。

【実験】
EGF の C 末端に Histidine を 6 つ融合させた EGF-His を大腸菌発現系によって合成した。金を蒸着したガラスプレート表面に、11-Mercapto-1-undecanol 及び 11-Mercapto-1-undecanoic acid を様々な組成で含む溶液を用いて、末端が OH または COOH の自己組織化単分子膜(SAM)を形成させた。これらの SAM 表面上に *N*-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid 及び $NiSO_4$ を介して EGF-His を固定化し、培養基板を得た。一方、マウス iPS 細胞を単個細胞に分散させた後、Pluronic F127 でコートし表面を親水化したディッシュに播種し、2% B27、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、および 10 nM retinoic acid を添加した DMEM/F-12 培地を用いてニューロスフェア培養を行った。6 日間培養し直径 100～200 μm の細胞凝集体を形成させた。形成された細胞塊を分散させ、再度同じ条件で凝集させた。細胞の凝集と分散を 4 回繰り返すことで得られた細胞内に発現する NPC マーカー等の発現を qPCR 法により分析した。得られた NPC を EGF-His 固定化基板上にて培養し、増殖能を調べた。

【結果と考察】
ニューロスフェア培養を繰り返し、qPCR を行った結果、継代を繰り返すごとに、未分化マーカーである Nanog 及び Oct3/4 の発現は減少した。一方 NPC のマーカーである Nestin の発現は徐々に上昇し第三世代凝集体において最も高い値を示した。EGFR の発現も同様であった。得られた NPC を EGF-His 固定化基板に播種したところ、NPC に特徴的な二次元の網目状構造を形成して増殖した（図 1）。EGF-His 固定化基板上では、COOH の比率にかかわらず細胞増殖が認められ、培養 7 日目に細胞数が約 3 倍に増加した。一方未分化 iPS 細胞は EGF-His 固定化基板に細胞接しなかった。以上の結果から、EGF-His 固定化基板は、iPS 細胞から誘導した NPC の増殖に有効であると考えられる。

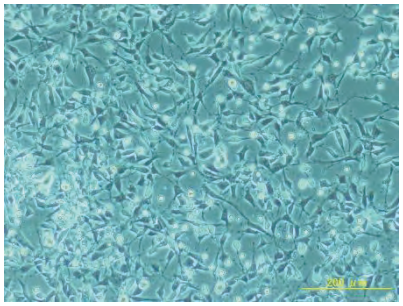


図 1. EGF-His 固定化基板上で 4 日間培養した NPC の位相差顕微鏡像．（スケールバー：200 μm）

Culture Substrates for the Efficient Expansion of Neural Progenitor Cells Derived from iPS Cells

Yuka Yamauchi[1,2], Isao Hirata[1], Kotaro Tanimoto[2], Koichi Kato[1]
[1]Department of Biomaterials, Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University
[2]Department of Orthodontics and Craniofacial Developmental Biology, Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University
Tel: +81-82-257-5648, Fax: +81-82-257-5649, E-mail: yuuka-y33@hiroshima-u.ac.jp

1P-076

簡便かつ効率的に単一細胞種を分画するためのシステム開発

[1]富山大学大学院理工学教育部（工学），[2]富山大学大学院生命融合科学教育部（先端ナノバイオ），
[3]物質・材料研究機構，[4]日産化学（株）
○関　愛梨[1]，中路　正[1,2]，吉川　千晶[3]，臼井　友輝[4]，岸岡　高広[4]，西野　泰斗[4]

【緒言】迅速に単一細胞種を得る技術の確立は、細胞機能評価、分化誘導評価、細胞移植源の確保など様々な領域で必要とされている。現在、いくつかの細胞分離法が存在するが、中でも蛍光活性化細胞選別や磁気活性化細胞選別などのフローサイトメトリー法が最も広く用いられている。しかしながら、この手法では、細胞を選別するために用いられるラベル化剤が残存してしまうため、細胞自体への影響（特に細胞の特性変化など）が懸念され、医療に用いる細胞を分離する手法としては不適であると考えられる。また、密度勾配遠心法による分離も挙げられるが、この手法では、生体に対して毒性があるパーコールやフィコールなどの試薬を使用しなければならないという大きな問題を抱える。近年では、細胞の大きさの違いを利用して分離する細胞分離膜透過法も開発され利用され始めているが、ほぼ同径の異種細胞は完全に単離できないという欠点がある。このように、近い将来実用化されるであろう細胞医療において、細胞の単離・精製するための最適な方法が、現状では存在しないと言わざるを得ない。そこで本研究では、これまでの細胞分離技術の様々な課題を克服した分離システムの構築を目指す。

【実験】Carboxymethyl betaine (CMB), 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (MPTMS), propargyl methacrylate (PGMA) からなる三元共重合体をフリーラジカル重合により得た。合成した P(CMB-*co*-PGMA-*co*-MPTMS) は、シランカップリング基を介して基材上へ修飾させた。その後、azido-homoalanine (AHA) を C 末端に有する CD44 結合性ペプチド (QQGWFP-AHA, CD44BP) を、PGMA のアルキンと AHA のアジド基間のクリック反応により基材表面に修飾した。

三元共重合体で改質された基材表面と CD44BP を担持させたポリマーで改質された表面の特性について、接触角測定、膜厚測定、全反射赤外分光測定、および microBCA 法によるペプチド担持量測定およびタンパク質非特異吸着測定により評価した。さらに担持させたオリゴペプチドによる特定細胞の捕捉を評価するためにマウス線維芽細胞 (NIH3T3 細胞)、ヒト胎児腎由来細胞 (HEK293)、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の接着を観察した。

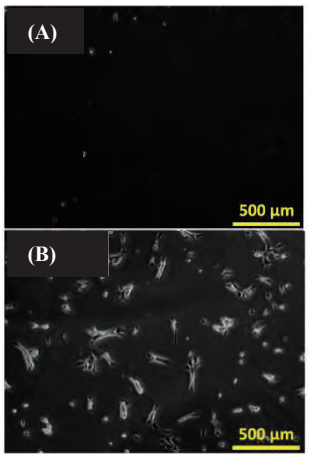


Figure 1. Phase contrast images of hMSC cultured for a day on the surface modified with (A) P(CMB_{70}-*co*-$PGMA_{20}$-*co*-$MPTMS_{10}$) and (B) CD44BP-modified P(CMB_{70}-*co*-$PGMA_{20}$-*co*-$MPTMS_{10}$).

【結果と考察】接触角測定、膜厚測定、全反射赤外分光測定および microBCA 測定より、CD44BP が三元共重合体を介して表面に担持されていることが示された。また、CD44BP 担持／非担持いずれのポリマー修飾表面においても、タンパク質の非特異的吸着が抑制されていることが分かった。これは生体物質非応答性を示す双性イオン型モノマーである CMB を含む三元共重合体により被覆したことに起因するものと考えられる。CD44BP 担持ポリマー修飾表面への細胞捕捉を調査した結果、NIH3T3 と HEK293 細胞は表面に捕捉されなかったのに対し、hMSC では捕捉が認められた。また、複数種混合した細胞懸濁液を接触させた場合においても、hMSC のみ捕捉されることが分かった。これらの結果は、ポリマーに担持させた CD44BP を介して CD44 抗原を有する hMSC を選択的に捕捉できることを示すものである。

Development of simple and convenient system for single cell separation

Airi Seki[1], Tadashi Nakaji-Hirabayashi[1,2*], Chiaki Yoshikawa[3], Yuki Usui[4], Takahiro Kisioka[4], Yasuto Nishino[4]
[1]Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, [2]Graduate School of Innovate Life Science, University of Toyama, [3] International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute of Material Science, [4]Nissan Chemical Corporation.
Tel: +81-76-445-6552, E-mail: m1871410@ems.u-toyama.ac.jp

1P-077

分子認識部位を導入した温度応答性ポリマーの設計と変性タンパク質認識挙動

[1] 関西大学化学生命工学部，[2] 関西大学 ORDIST
○尾崎亮太 [1]，河村暁文 [1,2]，宮田隆志 [1,2]

【緒言】一本鎖の新生ポリペプチド鎖が生体内でフォールディングされることにより，タンパク質は様々な機能を発現し，生命の活動を維持する。しかし，コンフォメーションが変化すると，タンパク質の機能が消失する。また，変性タンパク質が凝集すると，アルツハイマー病およびプリオン病などのフォールディング病が引き起こされる。これらのフォールディング病の診断には，タンパク質のコンフォメーション変化を認識して迅速に応答する材料の開発が必要である。一方，疎水性の空孔をもつシクロデキストリン（CD）は疎水性化合物を包接することが可能である。たとえば，CD は芳香族アミノ酸と包接錯体を形成することが報告されている。本研究では，タンパク質のコンフォメーション変化を識別する分子システムの創製を目的として，ポリマー状態で下限臨界溶液温度（LCST）を示すポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）とタンパク質認識部位である CD とからなる CD 導入 PNIPAAm 誘導体（P(NIPAAm-*co*-CD)）を合成した。また，モデルタンパク質であるリボヌクレアーゼ A（RNase A）存在下における P(NIPAAm-*co*-CD)の LCST 変化について検討した（Fig. 1）。

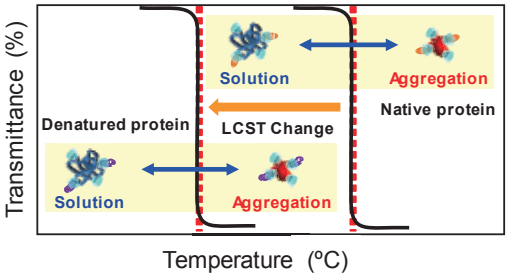


Fig. 1. Schematic illustration for LCST change of a temperature-responsive polymer with protein recognition sites in response to a conformational change of protein.

【実験】NIPAAm，アクリロイル基を導入した CD（acryloyl-CD）および 2, 2'-アゾビスイソブチロニトリルをジメチルスルホキシドに溶解させ，窒素雰囲気下において 70 °C で 6 時間重合することにより，P(NIPAAm-*co*-CD)を合成した。得られた P(NIPAAm-*co*-CD)をリン酸緩衝液（50 mM, pH 7.4）に溶解させ，ネイティブ RNase A および変性 RNase A を添加した際の LCST 変化を濁度測定により評価した。

【結果と考察】Fig. 2 には，P(NIPAAm-*co*-CD)を溶解させた緩衝液に変性 RNase A を添加した際の LCST とタンパク質濃度との関係を示した。図より，CD 導入率 7.2 mol%および 10.8 mol%の P(NIPAAm-*co*-CD)は，それぞれ 34 °C と 36 °C 付近に LCST を示した。これは，親水性の CD 導入率が高いほど，P(NIPAAm-*co*-CD)の親水性も高くなるためと考えられる。また，変性 RNase A 濃度が増加すると，いずれの P(NIPAAm-*co*-CD)の LCST も低下した。変性 RNase A 濃度が高いほど，P(NIPAAm-*co*-CD)と変性 RNase A との複合体が増加するために，より顕著に LCST が低下したと考えられる。さらに，CD 導入率が高い P(NIPAAm-*co*-CD)の方が，変性 RNase A 濃度の増加に伴って LCST がより顕著に低下した。これは，CD 含有率の高い P(NIPAAm-*co*-CD)の方が，より多くの変性 RNase A と CD が複合体を形成してポリマー鎖の親水性が低下するためと考えられる。したがって，P(NIPAAm-*co*-CD)は変性タンパク質を検出する新規な診断材料としての応用が期待できる。

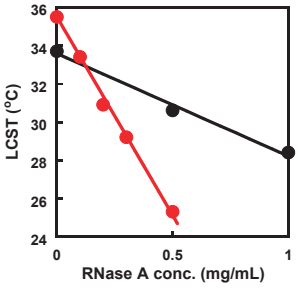


Fig. 2. Effect of temperature on transmittance (650 nm) of P(NIPAAm-co-CD) (CD content: 7.2 (●), 10.8 (●) mol%) in a phosphate buffer solution (pH 7.4, 50 mM) with denatured RNase A. Concentration of P(NIPAAm-co-CD) was 2.0 mg/mL.

Design of Temperature-responsive Polymers with Molecular Recognition Sites and Their Recognize of Denatured Protein

Ryota OZAKI[1], Akifumi KAWAMURA[1,2], Takashi MIYATA[1,2]
[1]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering [2]ORDIST, Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, JapanTel: +81-6-6368-0949, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: tmiyata@kansai-u.ac.jp

1P-078

中間水を有する枝分かれポリグリセロールの中性子散乱法による水和状態解析

[1] 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻,
[2] 九州大学大先導物質化学研究所
○山崎　萌[1], 杉本　洋輔[1], 大谷　亨[1], 田中　賢[2]

【緒言】　枝分かれ構造を有する生体適合性ポリマーであるポリグリセロールデンドリマー(PGD)やハイパーブランチポリグリセロール（HPG)は、化学修飾可能な多数の末端基を有し、直鎖状ポリマーと異なるユニークな性質を有していることからバイオマテリアルの分野で応用が期待されている。PGD が完璧な分岐構造を有している一方で、HPG は分岐構造と直鎖構造の両方を有し、ランダムに分岐している。また、PGD や HPG は繰り返し単位に疎水性のメチレン、メチン骨格を有しているため、水中において分子内に極性の低いミクロ構造を形成することが報告されている。PGD, HPG は同じ構造式、同じ分子量であっても、分岐度の違いにより末端水酸基の位置が異なるため、ポリマー自体の物理化学的性質や、生体分子との相互作用が変化する可能性がある。このような分岐度効果の検証は新たなバイオマテリアルをデザインする上で多様な選択肢を生み出す足がかりになると考えられる。しかし、個々のポリマーに関する研究は多数行われているものの、それぞれのポリマーを比較した際の特性の違いは明らかではない。そこで本研究では、PGD 及び HPG の分岐性が生体適合性の指標である水の構造（自由水、中間水、不凍水）を示差走査熱量測定(DSC)、を用いて定量化した。さらに分子レベルでのそれぞれの分子が有する水和構造を中性子小角散乱（SANS）測定により解析した。

【実験】
PGD, HPG の合成:PGD をアリル化反応、オスミウム酸化反応により合成した。HPG をアニオン開環重合により合成した。合成の確認を ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, および MALDI-TOF-MS から行った。
PGD, HPG の水の定量化:HPG(分子量 1,659), PGD(分子量 1,689)の様々な濃度の水溶液を調製し、DSC によって得られた水の融解エンタルピーから中間水量、自由水量、不凍水量を算出した。
PGD, HPG の分子構造解析:D_2O/H_2O 混合溶媒にそれぞれ PGD もしくは HPG を 0.5 wt%で溶解し、SANS 測定によって分子レベルでの構造解析を行った。

【結果と考察】　DSC から得られたチャートから、ガラス転移温度と融点の間の温度で生じる低温再結晶は枝分かれ度に関わらず全ての試料において観測された。これらの結果は中間水も含まれることを示しており、多くの報告例がある PGD や HPG の非タンパク質吸着特性を支持するものであった。さらに、水の融解エンタルピーから、ポリマーと強く相互作用し、-100℃ 以下でも凍らないとされる「不凍水」量を各ポリマーについて算出したところ、分岐度の増大に伴って不凍水量は増大した。分岐度の高い PGD や HPG は水中で 3 次元の球状構造をとっており、球周辺の水分子はポリマーが有する水酸基と多点で相互作用したために、直鎖のポリエチレングリコール（PEG）よりも不凍水が増えたことが考えられる。一方で PGD や HPG のグリセロール骨格に囲まれた水分子は運動性が制限され、他の水分子との水素結合が弱まるために凍結しにくくなったことが示唆された。SANS 測定の結果、HPG は球状構造、PGD はコアシェル球状構造に近い構造をとることが示唆された。さらに、溶媒とサンプルの散乱長密度のコントラストから HPG では分子内部での水和が確認されたが、PGD では分子表層に水和殻のような構造が見られた。このことから、分岐度が増加するに従って分子表面の水酸基が増加し、水分子が強くポリマーと水素結合したと考えられる。これらの結果は、分子の分岐構造が大量の不凍水の保持に適していることを示唆した。この枝分かれ分子特有の水和構造は新しいバイオマテリアルへの発展が期待される。

Hydration State of Dendritic Polyglycerols Bearing Intermediate Water

Moe Yamazaki[1], Yousuke Sugimoto[1], Tooru Ooya[1], Masaru Tanaka[2]
[1]Graduate School of Engineering, Kobe University,
[2]Institute for Materials Chemistry and Engineering Kyushu University
Tel: +81-78-803-6255, Fax: +81-78-803-6255, E-mail: ooya@tiger.kobe-u.ac.jp

1P-079

金を配列制御した Fe_3O_4/Au@SiO_2 ナノ複合粒子の表面増強ラマン散乱による生体分子検出

[1] 東京工業大学 物質理工学院 材料系
○ 鈴木 敦也[1], 生駒 俊之[1]

【緒言】

表面増強ラマン散乱（SERS）は、レーザー照射下で、金や銀のナノ粒子が近接しているとホットスポットが形成され、そこに吸着した生体分子のラマン散乱が増強される現象である。すなわち、吸着した生体分子を短時間にラベルフリーで検出することが可能であり、疾患診断への応用が期待されている。しかし、ラマン散乱の増強度は、生体分子の吸着サイトに強く依存するため、金属表面の精密な構造制御、かつ検出分子の吸着サイトの増加が必要である。本研究では、四酸化三鉄（Fe_3O_4）ナノ粒子表面に金を被覆し、さらにチオールの自己組織化膜を形成させ、金ナノ粒子（AuNP）の配列を制御したナノ複合粒子を作製した。また、最外層の AuNP 間に親水性の二酸化ケイ素（SiO_2 ; 以下シリカ）を被覆し、生体分子のホットスポットへの吸着を制御した。AuNp の配列制御により高感度な SERS 活性をもち、外部磁場により集積／生体分子を分離可能なナノ複合粒子を創出した。ナノ複合粒子の SERS 感度は、葉酸（FA）などの濃度変化による増強度の変化率で評価した。

【実験】

クエン酸ナトリウムを用いて湿式法で合成した Fe_3O_4 ナノ粒子に、表面に吸着したクエン酸の還元作用で金を被覆した粒子（Fe_3O_4/Au）を作製した。この粒子表面にドデカンチオール/デカンビスチオールを一定量の割合で修飾し、チオール基を露出させた。このチオール基に、平均粒子径約 30nm の AuNP を結合させ、Fe_3O_4/Au 表面に固定化した（Fe_3O_4/Au@AuNP）。粒子表面へのシリカの複合化は、NH_3 水溶液中に Fe_3O_4/Au@AuNP とテトラエトキシシラン（TEOS）を添加したゾル-ゲル法で行った（Fe_3O_4/Au@SiO_2）。作製した各粒子のそれぞれを 10^{-5}～10^{-8} M の FA 溶液に所定量を加え、10 分静置した後、外部磁場で集積させてラマン散乱を測定した。

【結果と考察】

AuNP を配列した試料の紫外可視分光スペクトルでは、最外層に形成させた AuNP が近接することによる局所表面プラズモン共鳴ピークの分離が 539 nm と 678 nm に観測され、AuNP の修飾・配列が確認された。Fe_3O_4/Au@SiO_2 の形態観察では、直径 250 nm の球形粒子が観察され、反射電子像からは Fe_3O_4/Au@AuNP のシリカとの複合化が観察できた。10^{-6} M の FA を吸着させた溶液へのラマン散乱の測定結果では、AuNP を配列した試料のみ FA のピークが 1452cm^{-1} と 1089cm^{-1} に観測された（Fig. 1）。さらに、898cm^{-1} のチオールのピークを基準として FA の 1452cm^{-1} との強度比から SERS の濃度依存性を評価した。どちらの試料も 10^{-8} M の FA を検出でき、ナノ粒子表面をシリカで被覆することで、増強度の変化率が大きくなり、濃度変化に鋭敏に反応したことから SERS 感度が向上したことが分かった。これは複合粒子表面をシリカで被覆することで、シリカに優先的に FA が吸着し、検出分子の吸着サイトを増大させた結果と考えられる。

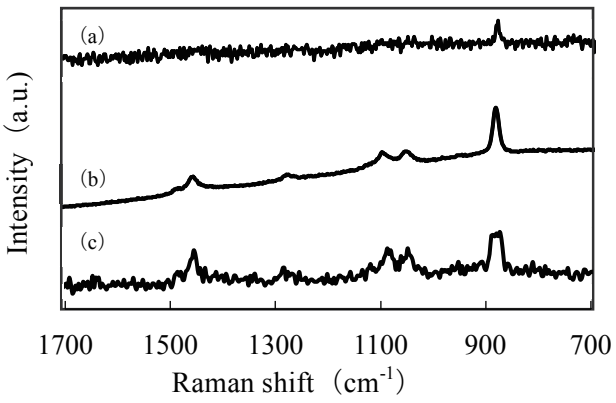


Fig. 1 FA を吸着させたナノ複合粒子のラマンスペクトル: （a）Fe_3O_4/Au,（b）Fe_3O_4/Au@AuNP,（c） Fe_3O_4/Au@SiO_2

Biomolecule detection by surface enhanced Raman scattering of Fe_3O_4/Au@SiO_2 nanocomposite particles with controlled gold arrangement

Nobuya Suzuki[1], Toshiyuki Ikoma[1]
[1]Department of Materials sciences and Engineering, Tokyo Institute of Technology,
Tel: +81-3-5734-3960, Fax: +81-03-5734-3369, e-mail: tikoma@ceram.titech.ac.jp

1P-080

Cytodiagnosis of Hypersialylated Metastatic Cancers by Phenylboronic acid-installed PEGylated Gold Nanoparticle Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

[1]Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan, [2]Material Synthetic Research Department, Nissan Chemical Industries Ltd., Funabashi, Chiba, Japan, [3]Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan
○Babita Shashni[1], Yukichi Horiguchi[1], Kosuke Kurosu[1], Hitoshi Furusho[1], Yukio Nagasaki[1,3]

【INTRODUCTION】Cytodiagnosis of metastatic cancers at early stages could greatly limit the number of metastasized cancer-associated mortality. Recent advances in metastatic cancer research have clearly demonstrated that high cell surface density of sialic acid (5-amido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (neuraminic acid, Neu5Ac)) in malignant transformed cells correlates with their metastasis incidence. Hence, detection of hypersialylated tumors may be an effective strategy to identify metastatic cancers. Moreover, critical dependence of metastatic cancers on reactive oxygen species to maintain hypersialylation signaling pathway accentuates the requirement of redox therapeutics to manage metastatic cancers. Hence, herein report on the diagnosis of hypersialylated cancers by phenylboronic acid-installed PEGylated gold nanoparticles coupled with a Raman reporter, Toluidine blue O (T/BA-GNPs) using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and their management by our original ROS scavenging polymeric micelle, nitroxide-radical containing nanoparticles (RNPs).

【METHODOLOGY】Gold nanoparticles (GNP) were surface functionalized by 3-aminophenylboronic acid (APBA)-poly(ethylene glycol)-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)] (PEG-*b*-PAMA) polymer (APBA-PEG-*b*-PAMA). APBA selectively targets neuraminic acid (Neu5Ac), whereas PEG and PAMA segment acts as dispersion agent and attaches to GNP, respectively (Figure 1). To demonstrate the performance of this SERS-based detection system, Toluidine blue O (Raman reporter) and APBA-PEG-*b*-PAMA co-immobilized on GNPs (T/BA-GNPs) were tested by *in vitro* and *ex vivo* experiments. Abrogation of ROS sensitive sialic acid pathway by RNPs was confirmed by expression studies.

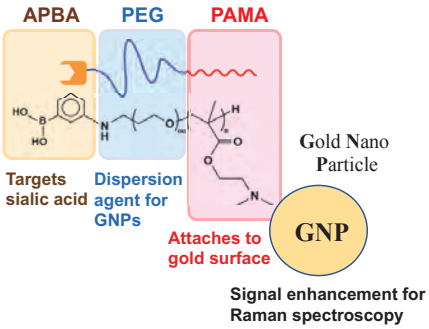


Figure 1. Sialic acid targeting APBA-PEG-b-PAMA-GNP

【RESULT and DISCUSSION】The results obtained from these studies are listed as follows:

1. The average diameter of T/BA-GNPs prepared was ca. 53 nm with a zeta potential (mV) of -0.5 at pH 7.4.
2. Strong SERS signals from metastatic cancer cell lines (breast cancer; MDA-MB-231 and colon cancer; Colon-26) were observed, contrary to non-metastatic MCF-7 cells (breast cancer). The detected SERS signals from various cancer cell lines correlated with their reported metastatic potential, implying that our T/BA-GNP based SERS system was capable of distinguishing the metastaticity of cells based on the surface Neu5Ac density.
3. T/BA-GNP based SERS system also significantly differentiated between hypersialylated tumor (MDA-MB-231 tumor xenograft model), low sialylated tumor (RNP treated MDA-MB-231 cancer cells) and healthy tissues.
4. Upon RNP treatment, a reduction in sialic acid-associated SERS signals from MDA-MB-231 surface was observed, which was attributed to ROS-mediated disruption of sialylation by impairing the activation of NF-κB-sialyltransferase signaling cascade.

Cytodiagnosis of Hypersialylated Metastatic Cancers by Phenylboronic acid-installed PEGylated Gold Nanoparticle based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Babita Shashni[1], Yukichi Horiguchi[1], Kosuke Kurosu[1], Hitoshi Furusho[1], Yukio Nagasaki[1,3]
[1]Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan,
[2]Material Synthetic Research Department, Nissan Chemical Industries Ltd., Funabashi, Chiba, Japan,
[3]Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan
Tel: +81-029-853-5936 Fax: +81-029-853-5749
E-mail: shashni@ims.tsukuba.ac.jp, happyhusband@nagalabo.jp

1P-081

細胞外ベシクルの簡便・高感度検出のための マイクロチップおよび検出プロトコルの検討

東理大院基礎工[1]・順天堂大医[2]・理研前田バイオ[3]
○片桐明日香[1]，石原量[2]，中島忠章[1*]，細川和生[3]，前田瑞夫[3]，友岡康弘[1]，菊池明彦[1]

【緒言】　がんのバイオマーカーとして，体液中に存在する細胞外ベシクル(EV)が，その内部や膜にがん特異的な核酸やタンパク質を含むことから注目されている[1, 2]。既存の EV 検出手法は，煩雑で時間がかかり，多くの試料体積が必要となる[3]。そのため，EV を，その場検査(POCT)に利用するという観点からは課題が残る。当研究室では，POCT を実現する材料として，低コスト・短時間・少ない試料体積・ポンプ無しで使用できる poly(dimethylsiloxane) (PDMS)製マイクロチップ[4]に，UV グラフト重合法を適用し，機能性を付与した自律駆動マイクロチップ(SF-PF microchip)を作製し，EV の簡便な検出に成功している[5]。また，流路の一部を狭窄させ抗体と機能化表面の接触効率を向上させ，高感度化にも成功した。しかし，体液中に存在するがん細胞由来の EV を検出するためには，さらなる高感度化が課題であった。そこで本研究では，自律駆動のために必要な乾燥工程が一部の抗体を失活させている可能性を考え凍結乾燥を導入し，さらに，より高効率かつ多量の EV を捕捉するために検出プロトコルを改良することで検出の高感度化をめざした。

【実験】　光増感剤である benzophenone (10 wt% in acetone)を PDMS マイクロチップ流路表面に固定し，2-aminoethyl methacrylate (AEMA) (0.25~3.0 mol/L in water)で流路を満たし，10 分間 UV 照射(365 nm, 100 W)し，PAEMA をグラフト重合した。さらに，anti-CD63 抗体 (1.0 mg/mL)で流路を満たし，37 °C で 2 時間，湿度 100 %で静置して抗体を固定し，その後脱気した。抗体固定後に 2 μL の超純水で流路を満たし, 凍結乾燥した。作製した SF-PF microchip を用いて, 乳がん細胞(MCF-7)由来の EV を，層流樹状増幅法(LFDA)[6]によって検出した。

【結果と考察】　ブロッキング，EV 捕捉，蛍光シグナル増幅の 3 ステップからなる LFDA の，EV 捕捉ステップを 5 分から 10 分間まで延長することで，signal/blank 比は，3.5 倍となり，5%水準で有意に増加した(two-tailed *t*-test, n=3)。これは，EV と機能化表面との接触確率が改善したためである。また，SF-PF microchip を凍結乾燥したのちに EV 検出した結果，signal/blank 比は 15 から 20 となり, 5%水準で有意に増加した(two-tailed *t*-test, n=3) (**Fig. 1**)。これは，凍結乾燥しない場合と比較して，より多くの抗体の構造が保たれ，抗体活性を維持できたためと考えられる。本研究において必要とされるサンプル量は 2.0～3.0 μL であり，検出に必要な時間は 25 分以内であった。以上のことから，本研究で提案している SF-PF microchip は，がんの POCT 実現への貢献が期待できる。

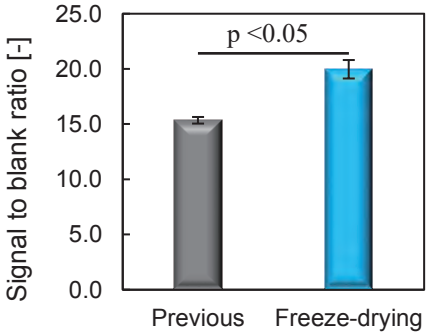


Fig. 1 Improvement of EV detection (mean ± SD, n=3).

【参考文献】　[1] H. Varadi *et al., Nat. Cell Biol.,* **2007**, 9, 654-659.　[2] S. Melo, *et al., Nature,* **2015**, 523, 177-182.　[3] B. Tauro *et al., Method,* **2012**, 56, 293-304.　[4] K. Hosokawa *et al., Lab Chip,* **2004**, 4, 181-185.　[5] R. Ishihara *et al., Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress,* **2016**.　[6] K. Hosokawa *et al*., *Anal. Chem.,* **2007**, 79, 6000-6004.

*現東大生産研

Investigation of the Microfluidic Chip and Detection Protocol For Rapid and Sensitive Extracellular Vesicle Detection

Asuka KATAGIRI [1], Ryo ISHIHARA [2], Tadaaki NAKAJIMA [1], Kazuo HOSOKAWA [3], Mizuo MAEDA [3], Yasuhiro TOMOOKA [1], Akihiko KIKUCHI [1]
[1]Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci., Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan [2]Fac. Med., Juntendo Univ., Inzai, Chiba, 270-1695, Japan [3]Bioeng. Lab., RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan
[2]Tel: +81-476-98-1001, Fax: +81-476-98-1011, E-mail : r-ishihara@juntendo.ac.jp

1P-082

表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた がん細胞由来細胞外ベシクルの検出

東理大院基礎工[1]・順天堂大医[2]・理研前田バイオ[3]
○松井崚[1]，石原量[2]，中島忠章[1*]，片桐明日香[1]，
細川和生[3]，前田瑞夫[3]，友岡康弘[1]，菊池明彦[1]

【緒言】　がんは転移前に発見することがきわめて重要であり，早期発見のためのバイオマーカーは，これまで多く研究されている[1]。その一つとして，細胞外ベシクル(EV)という細胞が恒常的に分泌する脂質二重膜から成る小胞体がある[2]。特にがん細胞由来 EV は，その膜表面にがん転移に関与するインテグリンを高発現していることが報告されている[3]。そのため，抗インテグリン抗体によりがん細胞由来 EV を検出することで，がん診断に繋がると期待できる。これまで我々は，表面機能化自律駆動マイクロチップ(SF-PF microchip)を用い，一般的な EV の短時間かつ簡便な検出に成功している[4]。この手法を用いれば，がん細胞由来 EV を検出できると考えられる。そこで本研究では，SF-PF microchip を用いたがん細胞由来 EV の検出を目的とした。

【実験】　幅 100 μm, 高さ 25 μm, 検出部位の高さ 8 μm の流路を有する PDMS マイクロチップに，開始剤の benzophenone (10 wt% in acetone, 4 μL)を通液した。次に， 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) (0.5 mol/L in water, 6 μL)を通液後，UV (365nm, 100W)を 10 分間照射し UV グラフト重合した。次に, 抗 integrin β1 抗体(0.01~0.50 mg/mL, 10 μL), 縮合剤の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (4.5 mg/mL, 1 μL)の混合溶液 2 μL で流路を満たし，37ºC で 2 時間，湿度 100%で静置し，EV 捕捉用抗体を固定した。1 時間以上脱気し SF-PF microchip を得た。抗体固定量は，作製したマイクロチップに二次抗体 (Alexa594)を通液した後，顕微鏡下で蛍光観察することにより評価した。作製したチップに層流樹状増幅法[5]を適用し，乳がん細胞 MDA-MB-231 由来 EV (5.0 nmol/L)を検出した。

【結果と考察】　流路内への抗体固定量は抗 integrin β1 抗体の濃度とともに増加し，0.50 mg/mL のときに最大となった。抗体濃度を 0.10，0.25，0.50 mg/mL として EV を流した左側の流路 (signal) ，および EV を流していない右側の流路 (blank) の蛍光強度の比 (signal to blank ratio; s/b 比) を求めた結果，この s/b 比は抗体濃度が高くなるほど増加した。すなわち，s/b 比は抗体固定量に依存することがわかった。抗体濃度を 0.50 mg/mL とし左側の流路に EV を流した場合と EV を流さない場合で s/b 比を検出した結果を **Fig. 1** に示す。EV の通液の有無で t 検定による 5%水準で有意差があった。この結果から，がん細胞由来 EV の検出を実証できた。なお，検出にかかった時間は約 30 分であり，これまでに提案されている様々な EV 検出法[6]よりも短かった。以上より，作製した SF-PF microchip のがん診断への応用が期待できる。

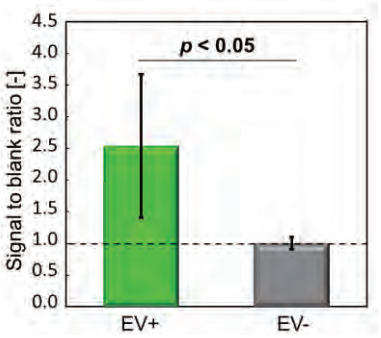


Fig. 1　Cancer cell-derived EV detection on the SF-PF microchip (n >= 3).

【参考文献】　[1] M. Pepe *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2001**, 93, 1054-1061. [2] E. Trams *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, 645, 63-70. [3] A. Hoshino *et al., Nature*, **2015**, 527, 329-335. [4] R. Ishihara *et al.*, *ACS Omega*, **2017**, 2, 6703-6707. [5] K. Hosokawa *et al., Anal. Chem.*, **2007**, 79, 6000-6004. [6] M. Verma *et al., BMC Clin. Pathol.*, **2015**, 15.
*現東大生産研

Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicle Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microchip

Ryo MATSUI[1], Ryo ISHIHARA[2], Tadaaki NAKAJIMA[1], Asuka KATAGIRI[1], Kazuo HOSOKAWA[3], Mizuo MAEDA[3], Yasuhiro TOMOOKA[1], and Akihiko KIKUCHI[1] [1]Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci., Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan [2]Fac. Med., Juntendo Univ., Inzai, Chiba, 270-1695, Japan [3]Bioeng. Lab., RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan
[2]Tel: +81-476-98-1001, Fax: +81-476-98-1011, E-mail: r-ishihara@juntendo.ac.jp

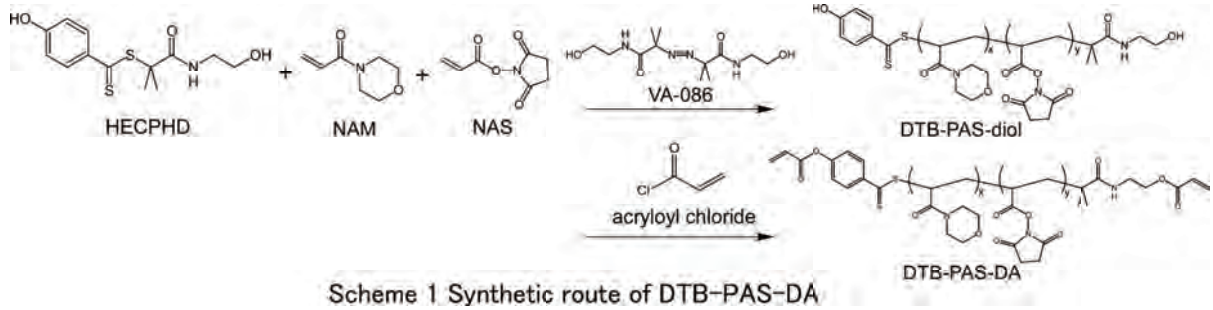
1P-083

新奇連鎖移動剤を用いたタンパク質固定化用高分子の RAFT 重合とゲル形成特性評価

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻　○森悠太　村上義彦

【緒言】タンパク質を固定化したデバイスは生体センサーとして病理診断システム等への応用が期待される。なかでも、ゲルはさまざまな機能性部位を組み込める空間を有し、膨潤・収縮可能であるなどの特徴を持つため、ミクロスケールの現象をマクロスケールに情報出力することに適したデバイスであると言える。近年、ゲル中に抗体や酵素などのタンパク質を組み込むことで、特定の分子を認識して体積変化を起こす分子応答性ゲルが注目されている。このようなゲルの実現には、ゲルネットワーク中に抗体や酵素などのタンパク質を固定化する技術が重要である。そこで本研究では、分子鎖中にアミノ基と反応する NHS エステルを有する、複数のタンパク質を固定化可能な高分子架橋剤を合成し、そのゲル形成能及びタンパク質固定化能を評価した。

【実験】タンパク質固定化用架橋剤の合成経路を以下に示した（Scheme 1）。末端にヒドロキシ基を有する新奇な連鎖移動剤 2-[*N*-(2-hydroxyethyl)carbamoyl]prop-2-yl 4-hydroxydithiobenzoate（HECPHD）とモノマー*N*-acryloylmorpholine（NAM）、*N*-succinimidyl acrylate（NSA）、及びラジカル開始剤 2,2'-azobis[2-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)propionamide]（VA-086）を 1,4-dioxane 中において 90℃で 5 時間撹拌し、RAFT 重合によって DTB-PAS-diol を合成した。さらに、合成した DTB-PAS-diol に対し acryloyl chloride と triethylamine を加え、dichloromethane 中において室温で 18 時間撹拌することで高分子末端をアクリロイル化し、高分子架橋剤 DTB-PAS-DA を合成した。合成した高分子架橋剤と、acrylamide、ammonium peroxodisulfate（APS）、及び tetramethylethylenediamine（TEMED）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS、20 mM、pH7.4）中で反応させることでゲルを調製した。また、PBS 中で DTB-PAS-DA に対してタンパク質としてウシ血清アルブミン（BSA）を反応させ、TNBS（trinitrobenzenesulfonic acid）法により高分子のタンパク質結合能を評価した。



Scheme 1 Synthetic route of DTB-PAS-DA

【結果と考察】DTB-PAS-DA を高分子架橋剤として用いてゲルを形成することによって、反応開始から 30 分後にゲル化が完了したことをバイアル傾斜法によって確認した（Fig. 1）。この結果より、DTB-PAS-DA が架橋剤として機能することが確認された。また、TNBS 法により DTB-PAS-DA に対する BSA 上のアミノ基の反応率を算出したところ、活性エステルを有する NSA のモル比が高い DTB-PAS-DA の方がより高い反応率を示すことが確認された（Fig. 2）。したがって、NSA 由来の活性エステルがアミノ基と反応し、高分子上にタンパク質が固定化されたことが示唆された。



Fig. 1 Acrylamide gel containing DTB-PAS-DA as a cross-linker

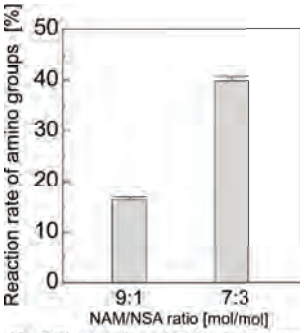


Fig. 2 The reaction rate of amino groups of DTB-PAS-DA

Synthesis of polymers for protein immobilization by using a novel RAFT agent and evaluation of their gelation properties

Yuta MORI, Yoshihiko MURAKAMI (Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakacho, Koganei, Tokyo 184-8588 Japan)
Tel/Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

1P-084

ポストインプリンティング修飾ポリマー修飾チップによる前立腺特異抗原の高感度検出

[1] 神戸大学大学院工学研究科，[2] 安田女子大学薬学部
松本 大樹[1]，砂山 博文[1,2]，○高野 恵里[1]，北山 雄己哉[1]，竹内 俊文[1]

【緒言】
バイオマーカータンパク質は特定の疾病においてその血中濃度が有意に変化するため、それらを高感度に検出するための分子認識素子は疾病の診断において重要な役割を果たす。バイオマーカータンパク質を検出する方法として、我々は、標的分子に対する特異的認識能をもつ人工高分子材料である分子インプリントポリマー（MIPs）の創出を行ってきた。さらに、MIP 中の分子認識空間内選択的に種々の官能基・分子を後天的に修飾することが可能なポストインプリンティング修飾（PIM）を独自に開発し、本手法を用いた高感度タンパク質検出材料の創製に成功している[1-3]。本研究では、前立腺がんのバイオマーカーである前立腺特異抗原(PSA)を認識可能な MIP 薄膜を作製し、高感度検出を試みた。

【実験】
PSA に相互作用可能な安息香酸部位をもち、重合後に PSA 認識空間内にポストインプリンティング修飾（PIM）を施すための 2 級アミン部位を併せもつ機能性モノマー4-[2-(*N*-methacrylamido)ethylaminomethyl]benzoic acid を合成し、基板上に固定化した PSA を鋳型分子として MIP 薄膜を作製した。その後、低濃度で PSA を結合させることにより、高親和性空間のみを保護した後、第 1 のポストインプリンティング修飾(PIM)により、低親和性 PSA 認識空間内の機能性モノマー由来 2 級アミン部位にポリエチレングリコール修飾を施すキャッピング処理を行った。

【結果と考察】
キャッピング処理により、低親和性 PSA 認識空間が無効化され、MIP 薄膜の PSA に対する結合特異性の向上が確認された。すなわち、分子インプリンティングおよびそれに続くポストインプリンティング修飾が、高親和性・高選択性 MIP 薄膜の創製に有効であることが示された。さらに、第 2 の PIM により PSA の高親和性認識空間のみに特異的に蛍光分子の導入を行い、独自に開発した微小反応板内蔵ピペットチップ型センシングシステムを用いて、簡便に PSA の高感度蛍光センシングが可能かについて検討したので報告する。

[1] Takeuchi, T. et al.*Chromatography* **2016**, 37, 43-64
[2] Horikawa, R. et al.*Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13023-13027.
[3] Takeuchi, T. et al. Chem. Commun, 54, 6243-6251 (Feature article)

Sensitive Detection of Prostate Specific Antigen by Molecularly Imprinted Polymer Thin Films Prepared via Post-Imprinting Modification

Hiroki Matsumoto[1], Hirobumi Sunayama[1,2], Eri Takano[1], Yukiya Kitayama[1], Toshifumi Takeuchi[1]
[1]Graduate School of Engineering, Kobe University
[2] Faculty of Pharmacy, Yasuda Women's University
Tel: +81-78-803-6158, Fax: +81-78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

1P-085

抗体の配向制御と安定性向上を実現する新規抗体固定化法の開発

[1] 産業技術総合研究所　バイオメディカル研究部門
○山添　泰宗 [1]

【緒言】抗体の優れた特異的結合能に着目し、多くの抗体固定化材料が開発され、目的物質の単離、標的指向型 DDS、病気の診断など幅広い分野で利用されている。様々な抗体固定化法が提案されているが、固定化した抗体の配向制御と安定性の向上は重要な課題である。近年、演者は、抗原を固定化した基板とタンパク質フィルムを利用した独自の手法により、抗体の配向制御と安定性向上を同時に実現する新しい抗体固定化法を確立した[1, 2]。しかし、この方法では、その工程で有機溶媒を用いており、作製した抗体固定化材料を生体に接触させて用いる場合には、残留溶媒による有害性が問題となる。そこで本研究では、前回の方法に改良を加え、有機溶媒など有害な化学薬品を用いない方法の確立に取り組んだ。

【実験】末端にメチル基、または、ビオチン（抗原）を有するアルカンチオールを用いて、金基板上に自己組織化単分子膜を形成させ、抗原固定化表面を作製した（Figure 1）。この基板に抗ビオチン抗体を加えて、配向を制御した形で抗体を配列させた後、エチレングリコールジグリシジルエーテルで架橋したアルブミンの溶液を加えた。37℃で乾燥させてフィルムを作製後、基板を高温で加熱することにより、抗原と抗体を解離させ、基板からフィルムを剥離した。フィルムに固定化された抗体の抗原結合能は、ビオチン化 horseradish peroxidase（HRP）をフィルム内の抗体と結合させ、HRP の活性を蛍光試薬を用いて測定することで評価した。また、抗体固定化フィルムを乾燥状態にて 40℃で 1 ヶ月保存し、抗体の長期安定性を検証した。

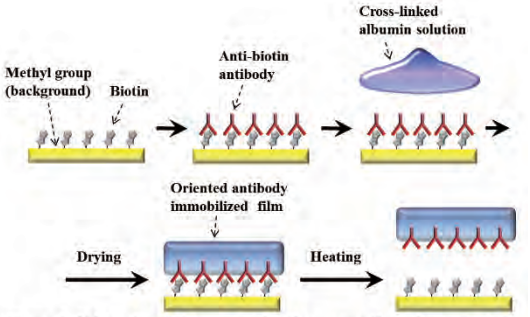


Figure 1. Schematic of the process for the preparation of an oriented antibody-immobilized albumin film.

【結果と考察】本抗体固定化法では、抗原を固定化した基板を利用することで抗体の配向を制御している。また、抗体分子の抗原結合部分以外の大部分をフィルム成分（アルブミン）で取り囲むことで、変性条件下においても抗体の大きな構造変化を防ぎ、固定化した抗体の安定性向上を図っている。前回の方法ではエタノールに浸漬することで基板から抗体固定化フィルムを剥離していたが、本研究では加熱処理による剥離を試みた。剥離に適した温度を決定するため、様々な温度で加熱してフィルムを剥離した後、フィルムの抗原結合能とフィルムに移行せずに基板上に残存した抗体量を調べた。その結果、80℃から 120℃の間では、温度の上昇とともに、フィルムに移行する抗体量が増加、ならびに、基板上に残存する抗体量が減少し、抗体フィルムの抗原結合能が向上することが分かった。しかし、140℃で剥離したフィルムでは、抗原結合能の著しい低下が見られ、剥離温度は 120℃が最適であることが分かった。本抗体固定化フィルムとプロテイン G を用いて配向を制御して固定化した抗体の抗原結合能を比較した結果、プロテイン G 法よりも優れた抗原結合能を有することが分かった。さらに、本抗体フィルムは、乾燥状態にて 40℃で 1 ヶ月間保存した後でも抗原結合能が全く低下することなく、高い安定性を有していることが分かった。一方、基板上に抗体を共有結合で固定化した比較対象のサンプルでは、1 ヶ月の保存後、その抗原結合能が 8 割近く失われていた。

〈参考文献〉

1）Yamazoe H., *Biomaterials*, 155, 1-12 (2018).
2）「抗体を含むタンパク質フィルム及びその製造方法」特願 2017-174215

Antibody immobilization technique using protein film for high stability and orientation control of the immobilized antibody

Hironori Yamazoe[1]
[1] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Tel: +81-29-861-6264, Fax: +81-72-751-9517, E-mail: hironori-yamazoe@aist.go.jp

1P-086

モレキュラービーコンによるアポトーシスの可視化

京都大学ウイルス・再生医科学研究所　生体材料学分野
○村田　勇樹，城　潤一郎，田畑　泰彦

【緒言】

細胞移植治療において、生体内に移植された細胞のアポトーシスを非侵襲的にイメージ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。本研究では、細胞内で恒常的に発現するグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）の mRNA を検出する MB（GAP MB）および、アポトーシス特異的に発現するカスパーゼ-3 の mRNA を検出する MB（casp3 MB）を用いた。生体吸収性高分子であるゼラチンからなるナノ粒子に MB を内包させ、細胞に取り込ませた。ナノ粒子を取り込んだ細胞にアポトーシスを誘導し、MB によるアポトーシスの可視化を試みた。

【実験】

ゼラチン（重量平均分子量 100,000、等電点 9.0、新田ゼラチン株式会社より供与）のカルボキシル基に対してスペルミンを結合させ、カチオン化ゼラチンを作製した。得られたカチオン化ゼラチンから、コアセルベーション法によりカチオン化ゼラチンナノ粒子（cGNS）を作製し、GAP MB あるいは casp3 MB と室温で 15 分間混合（20 pmole/μg cGNS）、遠心分離（14,000 rpm、30 分間）によって MB 内包カチオン化ゼラチンナノ粒子（$cGNS_{GAP\ MB}$ および $cGNS_{casp3\ MB}$）を作製した。得られたナノ粒子の見かけのサイズとゼータ電位は、動的光散乱法および電気泳動光散乱法によりそれぞれ測定した。

マウス間葉系幹細胞（KUM6）をガラスボトムディッシュに播種し、24 時間培養した。無血清培地に交換後、$cGNS_{GAP\ MB}$ あるいは $cGNS_{casp3\ MB}$ を細胞毒性の無い 10 μg /ml の濃度で添加し、3 時間培養した。PBS によって細胞を洗浄し、さらに培養を続け、ナノ粒子添加 12 時間後に異なる濃度の camptothecin（1、2、5、10、および 20 μM）を添加することでアポトーシスを 12 時間誘導した。アポトーシス誘導前後で細胞を蛍光顕微鏡にて観察し、得られた画像の蛍光強度を測定した。

【結果と考察】

$cGNS_{GAP\ MB}$ と $cGNS_{casp3\ MB}$ の見かけのサイズとゼータ電位は、それぞれ 200 nm および+8 mV であった。

図 1 は、$cGNS_{GAP\ MB}$ あるいは $cGNS_{casp3\ MB}$ を取り込んだ細胞のアポトーシス誘導後の蛍光強度測定結果である。$cGNS_{GAP\ MB}$ を取り込んだ細胞の蛍光強度は一定であったのに対し、$cGNS_{casp3\ MB}$ では、アポトーシス誘導後でのみ、有意に蛍光強度が増加した。これは、アポトーシス誘導によって細胞内カスパーゼ-3 の mRNA が増加し、細胞質に導入された casp3 MB と反応したためであると考えられる。

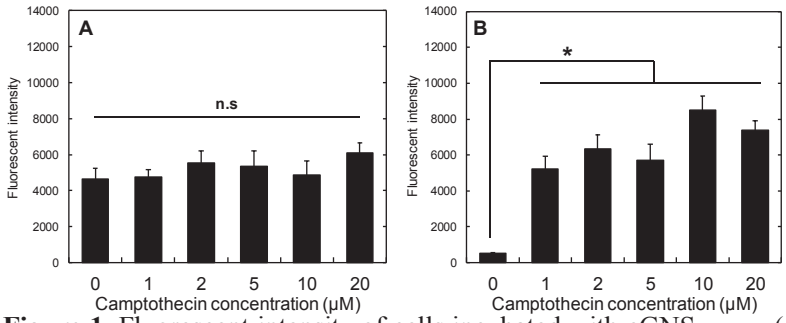


Figure 1. Fluorescent intensity of cells incubated with $cGNS_{GAP\ MB}$ (A) and $cGNS_{casp3\ MB}$ (B) after the addition of different concentrations of camptothecin. n.s; not significant. *, $p<0.05$; significant difference against the fluorescent intensity of camptothecin-free original cells.

Visualization of apoptosis with molecular beacon

Yuki Murata, Jun-ichiro Jo, and Yasuhiko Tabata
Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University
Tel: +81-75-4108, Fax: +81-75-4646, E-mail: murata.yuki.63v@st.kyoto-u.ac.jp

1P-087

多色深部イメージングを利用した腹膜組織における遺伝子発現・核酸送達評価法の開発

[1] 長崎大学大学院　医歯薬学総合研究科，[2] 長崎大学病院　薬剤部
○西村　光洋[1]，萩森　政頼[1]，三浦　雄介[1]，麓　伸太郎[1]，兒玉　幸修[2]，佐々木　均[2]，川上　茂[1]

【緒言】

腹膜線維症や腹膜への癌転移（腹膜播種）などの腹膜疾患に対する効果的な遺伝子・核酸治療のためには、これら疾患における DDS 開発および厳密な遺伝子発現・核酸送達の評価法が必要となる。我々はこれまで、血管や酸化ストレスなどの生体構造・環境と遺伝子発現の多色深部イメージングによる DDS 評価法を開発してきた。さらに、正常マウス腹膜に展開し、核・遺伝子発現・腹膜中皮細胞の 3 色同時観察に成功している [1)]。しかしながら、腹膜疾患時は正常時とは組織構造や細胞形態が異なるため、腹膜疾患時に多色深部イメージングにより組織構造と遺伝子発現・核酸送達の空間的な位置関係を正確に評価可能かは不明である。腹腔内組織表面は、腹膜線維症の起因となる中皮細胞が存在し、腹膜播種の癌細胞の定着先である。そこで我々は、腹腔内組織表面と遺伝子発現・核酸送達の位置関係を明らかにすることが重要であると考えた。本研究では、組織表面細胞を染色し、腹膜線維症・腹膜播種における新規多色深部イメージング評価法の構築を行った。さらに、構築した評価法を用いて、各腹膜疾患モデルマウスの腹腔内組織への遺伝子・核酸導入法における遺伝子発現・核酸の組織内空間分布の評価を行った。

[1)] 1. Nishimura K et al., *Drug Deliv*., **24**(1),737-744 (2017)

【実験】

腹膜線維症モデルマウス作製のため、グルコン酸クロルヘキシジン連日投与を行った。その後、超音波応答性ナノバブルと超音波照射 (Frequency: 1.045 MHz, Intensity: 1.0 W/cm^2) により pZsGreen1-N1 を導入した。また、腹膜播種モデルマウス作製のため、colon-26 細胞 (30 万個 /200 μL) を腹腔内投与した。癌細胞投与一定時間後、Alexa 647-VEGF siRNA/dendrigraft poly-L-lysine/γ-polyglutamic acid 複合体 (nanoball) を腹腔内投与した。遺伝子・核酸導入後、脂溶性蛍光色素 (DiI)の腹腔内投与により組織表面細胞を染色し、組織透明化処理後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

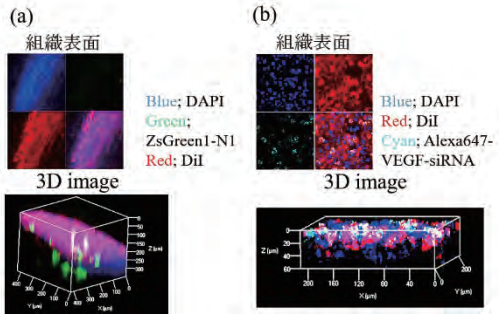


Figure 1. Multicolor deep imaging to peritoneal disease. (a) the distribution of transgene expression during mild peritoneal fibrosis. (b) the distribution of Alexa 647-VEGF siRNA in tumor nodule

【結果と考察】

脂溶性蛍光色素により腹膜疾患時にも腹腔内組織表面細胞を染色可能であり、組織表面の中皮細胞や癌細胞を観察可能であることが示された。そこで、腹腔内組織への遺伝子・核酸送達法に応用した。軽度腹膜線維症時では、ナノバブルと超音波照射により、腹腔内組織表面より下層で遺伝子発現が観察され、治療標的部位である中皮下層で遺伝子発現していることが示唆された。また、正常時の腹腔内組織において、nanoball 腹腔内投与ではほとんど siRNA の蛍光が観察されなかった。一方で、腹膜播種時では、癌細胞で siRNA の蛍光が観察され、nanoball 腹腔内投与により、癌細胞に siRNA が導入されていることが示唆された。このように、多色深部イメージング評価法は、腹膜線維症や腹膜播種といった腹膜疾患時において適用でき、腹膜組織にある細胞を標的とした標的指向型 DDS 開発において重要な方法論となり得ることが示唆された。

Development of evaluation method for gene expression/nucleic acid delivery in peritoneal tissue using multicolor deep imaging: evaluation of peritoneal fibrosis and peritoneal dissemination model mouse

Koyo Nishimura[1], Masayori Hagimori[1], Yusuke Miura [1], Shintaro Fumoto[1], Yukinobu kodama[2], Hitoshi Sasaki[2], Shigeru Kawakami[1]
[1] Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University
[2] Depertment of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital
Tel: +81- 95-819-8563 , Fax: +81- 95-819-8563 , E-mail: bb55316404@ms.nagasaki-u.ac.jp

1P-088

近赤外蛍光高分子ナノ粒子の第 2 の生体の窓を利用する in vivo イメージングへの応用

[1] 東京理科大学基礎工学部，[2] 東京理科大学イメージングフロンティアセンター
○上村　真生[1,2]，吉田　萌[1]，梅澤　雅和[1]，曽我　公平[1,2]

【緒言】
In vivo 蛍光イメージングは，生体内情報をリアルタイムに可視化できるため，現代の生命科学研究において欠かすことができない観察技術である。この in vivo 蛍光イメージングにおいて，特に近年，波長が 1000 nm を越える近赤外（over-1000 nm (OTN)-NIR)光が，生体組織透過性に優れることが明らかとなっており，積極的なイメージング応用が検討されている。しかしながら，OTN-NIR 蛍光を発する蛍光プローブのほとんどは，量子ドットやカーボンナノチューブなどの金属・無機ナノ物質であり，毒性や使用後の体外への排出などが問題となっている。そこで本研究では，OTN-NIR 蛍光を発し，腎排泄可能な分子サイズの低分子有機蛍光色素を，親水性の poly(ethylene glycol) (PEG) の片末端に疎水性の DSPE を有するポリマー (PEG-DSPE) からなるポリマーミセルのコア部に内包することで，OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルを作製し(Fig. 1)，マウスの in vivo イメージングを行った。

【実験】
PEG (2k)-DSPE と OTN-NIR 蛍光色素 (IR-1061) をアセトニトリル中に溶解し，純水を加えて大気中で攪拌することでアセトニトリルを除去した後，遠心フィルター精製することで OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルを作製した。この OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルを生理食塩水中に分散させ，マウス（ICR，雌，6 週齢）の尾静脈に投与し，OTN-NIR 蛍光イメージングシステムを用いて in vivo イメージングを行った。

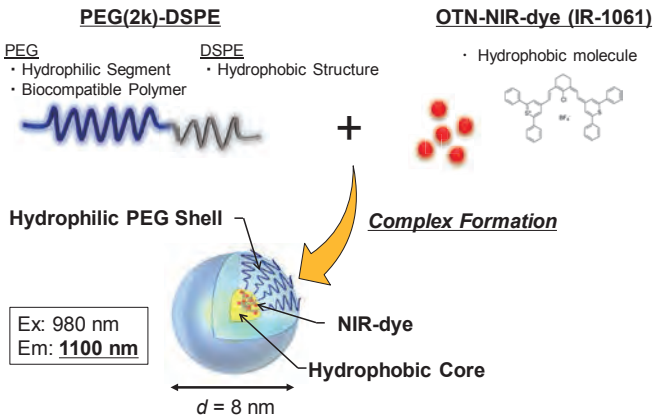


Fig. 1 OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルの設計。

【結果と考察】
動的光散乱測定の結果，平均粒径約 8 nm の OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルが形成されていることがわかった。この OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルの蛍光スペクトルを測定 (980 nm 励起) したところ，IR-1061 のみを HEPES 緩衝液中に添加した際には蛍光を確認することができなかったのに対して，OTN-NIR 蛍光ポリマーミセル溶液は波長約 1100 nm の強い OTN-NIR 蛍光を示した。これらの結果から，IR-1061 をポリマーミセルに内包することで，水中において分散・発光が可能になることが明らかとなった。さらに，この OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルをマウスに尾静脈投与することで in vivo イメージングを試みた。この結果，マウスが生きたまま解剖することなく，体内の血中に存在する OTN-NIR 蛍光ポリマーミセルの発する OTN-NIR 蛍光を，体外から観察することに成功した。これらの結果から，IR-1061 をポリマーミセルに内包することで，水中において高い分散安定性と安定した発光特性を有し，in vivo イメージングに利用可能な蛍光プローブを作製することに成功した。

Application of Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles for *in vivo* Imaging in the Second Biological Window

Masao Kamimura[1], Moe Yoshida[1,2], Masakazu Umezawa[1], Kohei Soga[1]
[1]Department of Materials Science and Technology, Tokyo University of Science
[2]Imaging Frontier Center, Tokyo University of Science
Tel: +81-3-5876-1414, E-mail: masaokamimura@rs.tus.ac.jp

1P-089

蛍光標識材料や蛍光標識型バイオセンサー等への応用を見据えた新規蛍光発光材料の開発

[1] ミヨシ油脂㈱, [2] 岐阜大学
○矢下 亜紀良[1], 川上 隼人[1], 河合 功治[1], 竹腰 和馬[2], 村井 利昭[2]

【緒言】

現在、蛍光発光物質は有機 EL ディスプレイ分野で注目される中、生物分野では、分子イメージ用プローブ、バイオセンサーでタンパク質、核酸などの生体分子の染色または化学的標識に用いられている。蛍光色素で化学的に標識された特異的抗体などの精製生体分子は、セルイメージングなどの実験における蛍光プローブとして、標的抗原や相互作用パートナーの検出に利用されている。また、バイオセンサーでは、蛍光タンパク質等の蛍光物質を利用した蛍光標識型バイオセンサー等が注目を集めている。

今回、我々はチアゾール骨格の特定部位に窒素原子を含む官能基を導入し新規蛍光発光材料の有機アミノチアゾール化合物を合成した。これらの化合物には、上記蛍光標識材料に必要とされるタンパク質結合性官能基であるアミノ基やカルボキシル基が導入された化合物や水溶性の化合物が含まれる。その他の化合物においても、光学特性（蛍光励起・発光スペクトル、蛍光発光収率、ストークスシフト等）において興味深い物性が得られた。得られた化合物は蛍光標識材料、バイオセンサーをはじめとする生物分野だけでなく、様々な分野で有用であり応用を見据えている。

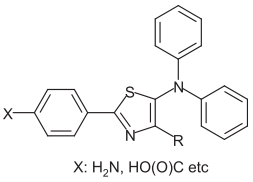
【実験】

種々のアミノチアゾール化合物の合成を行った。合成は合計 3 ステップまたは 4 ステップから成る。ステップ 1 では、チアゾール環の第 2 位へのヨウ化物を用いた選択的アリール化により中間体を得た。続いてステップ 2 では、チアゾール環の第 5 位への NBS による選択的臭素化を行い、最終ステップとして、ステップ 2 で得られた臭素化合物と 2 級アミン化合物とをブッフバルト・ハートウィッグ反応で結合させ最終生成物である種々のアミノチアゾール化合物を得た。

得られたアミノチアゾール化合物に関して、UV-Vis スペクトル、蛍光スペクトル等より光学特性を評価した。

【結果と考察】

ブロモチアゾール化合物とアミン化合物より種々アミノチアゾール化合物を得た。例えば、タンパク質結合性官能基であるアミノ基やカルボキシル基を有するアミノチアゾール化合物である。アミノ基やカルボキシル基を修飾することで、脂溶性のコントールや特定部位への集積を期待している。その他、アミノチアゾール化合物は、導入するアミン化合物の置換基等で蛍光発光波長のチューニングが可能であり、蛍光極大波長が青色、緑色、赤色とそれぞれ異なるアミノチアゾール化合物が得られた。いずれもストークスシフトは約 90nm 以上であり自己吸収が抑えられた化合物であり、特に青色、緑色化合物は量子収率が高い物性を有している。詳細は、当日のポスターで報告する。



X: H_2N, HO(O)C etc

化合物
（一般式）

蛍光量子収率	~ 0.83
蛍光極大波長 (nm)	457 ~ 703
ストークスシフト (cm^{-1})	5213 ~ 8451
半値幅 (cm^{-1})	2692 ~ 3691
励起エネルギー[a] (eV)	2.44 ~ 3.76

a : TD-DFT(CAM-B3LYP/6-31+G(d,p))

Figure 1. Structure of the compounds and evaluation results.

Biomaterials: Development of new fluorescence materials in anticipation of the applications to fluorescent labeling materials and biosensor and so on.

Akira Yashita[1], Hayato Kawakami[1], Koji Kawai[1], Kazuma Takegoshi[2], Toshiaki Murai[2]
[1] MIYOSHI OIL & FAT CO., LTD.
[2] Gifu University
Tel: +81-3-3602-8791, Fax: +81-3-3690-3542, E-mail: YASHITAA@so.miyoshi-yushi.co.jp

1P-090

体内植込み型医療デバイスコーティング材を目指した長期持続型抗菌ナノ粒子の開発

[1]近畿大学大学院生物理工学研究科，[2]奈良先端科学技術大学院大学
○石丸　佳樹[1]，Nalinthip　CHANTHASET[2]，網代　広治[2]，東　慶直[1]，古薗　勉[1]

【緒言】我が国では、平成 27 年に抗生物質を担持した中心静脈カテーテルが上市されたが、薬剤耐性菌発現の恐れによりその使用は厳しく制限されている。カテーテル関連感染症に限らず、抗生物質の多用による新たな薬剤耐性菌の発現は回避すべき課題である。近年、抗生物質に代わる抗菌材として、幅広い抗菌スペクトルを示す銀ナノ粒子の臨床応用が期待されている。銀ナノ粒子の抗菌効果は薬剤耐性菌に対しても良好であり、表面から徐々に銀イオンがリリースすることで長期間効果が持続するとの報告がなされている。ただし、銀ナノ粒子は強い抗菌性を有するため、体内での使用には十分な検討が必要である。そこで本研究では、抗菌性の制御および長期的な抗菌効果の持続を目的として、表面を有機物で保護された銀ナノ粒子を創出した。更に、水分散性および基材との反応性を向上させるために、表面に親水性基を導入し、カテーテル感染起因菌に対する抗菌性を評価したので報告する。

【実験】表面を保護された銀ナノ粒子の合成は、銀源、不飽和脂肪酸、還元剤を用いて窒素気流下で行われた。ナノ粒子の合成時に、反応時間および保護材の添加量を調節することで粒径制御を検討した。当ナノ粒子の同定には、TEM、XRD、UV-Vis、FT-IR、TG などを用いた。さらに、チオールエン反応によって表面のビニル基に水酸基を導入して親水性を向上させ、大腸菌（W3310 株）に対する抗菌性試験を粉末添加法によって実施した。

【結果と考察】XRD 測定により銀の結晶構造（面心立方格子構造）に由来するピークが確認された。加えて、UV-Vis 測定により表面プラズモン共鳴による吸収が認められたことから、生成物は銀ナノ粒子であることが認められた。合成工程において反応時間および保護材の添加量を調節することで、ナノ粒子は約 4～10 nm の間で粒径制御が可能であることが TEM 観察により見出された。また、TEM 像より粒子間距離を測定した結果、金属層の表面に有機物の単一層が形成されていると考えられた。FT-IR 測定結果から、当該ナノ粒子には不飽和脂肪酸が含まれることが認められた。還元剤であるステアリルアミンは銀ナノ粒子に対する吸着力が弱いために、保護材添加時に離脱すると考えられた。TG 測定結果により、保護材の添加量によって有機物含有量が制御され、銀源に対して十分な量の保護材を添加した場合、約 16～18 wt%の有機物を含むことが認められた。チオールエン反応によって水酸基を導入したところ、水分散性の向上が認められた。当ナノ粒子を用いて抗菌性試験を実施した結果、大腸菌に対して高い抗菌性を示し、その抗菌性は濃度によって制御されることが示された(Fig. 1)。不飽和脂肪酸のみで保護された銀ナノ粒子では全く抗菌性が認められなかったことから、親水性を付与し分散性を向上させることが抗菌活性の発現に効果的であることが明らかとなった。

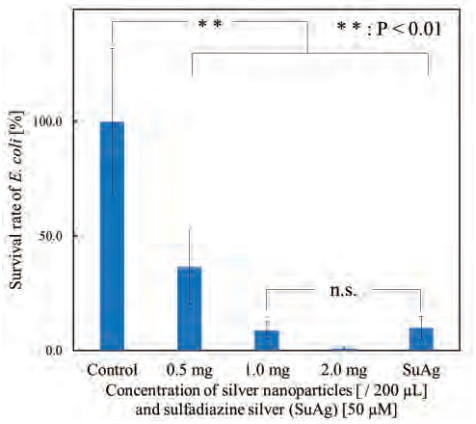


Fig.1 The result of the antibacterial test against *E. coli*　(n=4)

Development of long-lasting antimicrobial nanoparticles for coating materials on implantable medical devices

Yoshiki Ishimaru[1], Nalinthip Chanthaset[2], Hiroharu Ajiro[2], Yoshinao Azuma[1], Furuzono Tsutomu[1]
[1]Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University.
[2]Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology.
Tel: +81-0736-77-3888, Ext: 5206, E-mail: furuzono@waka.kindai.ac.jp

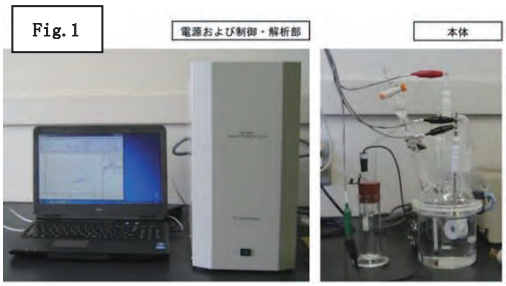
1P-091

Ti ベース合金の臨床応用実現に向けた医工学的検討

[1] 東北大学大学院歯学研究科，[2] 東北大学大学院医工学研究科
○王 鋭[1, 2]，横田 琴音[1]，古谷 真衣子[1]，金高 弘恭[1, 2]，菊池 雅彦[1]

【緒言】
Ti および Ti 合金は軽量，高強度，非磁性，耐食性，低アレルギー性など優れた特性を有している。NiTi 合金は,安定した形状記憶効果と超弾性特性を有していることから、卓越した機能性生体材料として広く利用されている。しかし、Ni は高いアレルギー性や発癌性があることが報告されているため、Ni を含まない新しい形状記憶合金の開発が望まれていた。そこで本研究では、Ni などの生体為害性の高い元素を含まず、生体材料としての生体安全性の高い金属元素から構成される新しい合金を開発し、新合金の臨床応用実現に向け、医工学的手法を用いて、多角的に検討を行うことを目的とした。

【実験】
本研究においては、Ti4Au5Cr5Ta 合金、Ti32Au16Co1Nb 合金、および Au28Cu22Al 合金をサンプルとして使用した。これらの合金の臨床的有用性を確認するために、下記の項目において、現在、広くインプラント材料として使用されている純 Ti、および、従来型の形状記憶合金である NiTi 合金との比較を行い、新合金の耐食性に関する評価を行った。
耐食性評価として、アノード分極試験（Fig.1）による耐食性試験を実施した。人口唾液は Fusayama saliva を参照にして作製した。フッ素洗口液としては 900ppmNaF 洗口液（昭和薬品化工）を使用する。サンプルは直径 15 ㎜のプレート状とし、試験片表面は，耐水研磨紙#120 から始め，順次番数を上げ，最終的に#2000 を用い，流水下で研磨を行った。研磨後エタノールで 10 分間超音波洗浄した。新合金の耐食性評価としては、人口唾液中、フッ素洗口液、人口唾液とフッ素洗口液の混合液中にてそれぞれ①アノード試験を実施した。また、試験前後において②XRD 解析、③XPS 解析、④SEM による表面分析観察測定行い、それぞれ比較検討した。



【結果と考察】
耐食性については，それぞれの新合金と既存の純チタン及び NiTi 合金の人口唾液及びフッ素洗口液による耐食性への影響を調べるために，それぞれの溶液中における電気化学的腐食挙動をアノード分極試験により評価した。結果、人口唾液中においては、Au28Cu22Al 合金以外の新合金の自然浸漬電位は，NiTi 合金及び純 Ti よりは高い値を示した。人口唾液+フッ素洗口液中やフッ化洗口液中においては、それぞれの新合金は NiTi 合金より低い値を示したが、純 Ti と同等な値であった。また，過不動態溶解開始電位は それぞれの溶液中においては、それぞれの新合金は純 Ti より高い値を示した。なお、NiTi 合金との比較はさらなる検討を必要とした。①これらのことから，それぞれの新合金は，口腔内環境を模擬したそれぞれの溶液中での耐食性に優れていることが確認された。 ②SEM 像では、いずれの合金も均一な研磨面が認められ、人口唾液、フッ素洗口液、人口唾液+フッ素洗口液中の順に孔食像が多く認められ、新合金は Ti より孔食像が少なく、アノード試験結果同様、耐食性に優れていることが確認された。③XRD の結果については、新合金は、それぞれの溶液中においては、NiTi 合金,純 Ti よりピーク強度やピーク位置の変化が少なく、耐食性に優れていることが確認された。なお、④XPS の結果については、さらなる検討が必要と考えられた。

Biomediacal engineering evaluation of Ti-base alloy for medical use

Rui WANG[1, 2], Kotone YOKOTA[1], Maiko FURUYA[1], Hiroyasu KANETAKA[1, 2], and Yasuhiko Kikuchi [1],
[1]Tohoku University Graduate School of Dentistry
[2]Tohoku University Graduate School of Biomaterial Engineering
Tel: +81-022-717-8434, Fax: +81-022-717-8434, E-mail: rui.wang.r4@dc.tohoku.ac.jp

1P-092

抗感染性バイオナノセラミックスの調製および抗菌メカニズムの検討

[1] 近畿大学大学院生物理工学研究科，[2] (株) ソフセラ技術開発センター
○大下　真璃 [1]，小粥　康充 [2]，上向井　徹 [2]，東　慶直 [1]，古薗　勉 [1]

【緒言】

腹膜透析(PD)は腎代替療法の 1 つであり、PD カテーテルにおける出口部感染(ESI)とそれに伴う腹膜炎の発症は解決すべき喫緊の課題となっている。事実として、ESI の発症率は約 22%という報告もなされている。これまでに我々は、カフにハイドロキシアパタイト(HAp)ナノ粒子をコーティングしたプロトタイプカテーテルを作製し、ポリエステル製カフ付きのものと比較したところ、感染阻止率が 9 倍向上することを見出した。

本研究室では、さらなる感染阻止率の向上を目指して、HAp に亜鉛(Zn)を置換した亜鉛置換 HAp(Zn-HAp)ナノ粒子を調製し、材料特性評価および抗菌活性評価を実施した。加えて、その抗菌メカニズムについて検討したので報告する。

【実験】

Zn-HAp ナノ粒子は硝酸カルシウム四水和物、硝酸亜鉛六水和物およびリン酸水素二アンモニウムを混合し、湿式法にて調製した。仮焼前のサンプルに融着防止処理を施すことにより、仮焼時におけるナノ粒子の焼結を抑制した。また XRD、FT-IR、ICP-OES および SEM を用いて、材料特性評価を行った。

Zn-HAp ナノ粒子が有している抗菌活性を評価するため、カテーテル感染起因菌に対する抗菌性試験を実施した。PET シートに Zn-HAp ナノ粒子をコーティングし、OD_{600}=0.01 に調製した菌液を塗布した。1 時間後、10 倍希釈を 5 回行い、LB 寒天培地にスポットした。37℃のインキュベータで 15 時間培養し、コロニー数を計測することで細菌の生存率を算出した。また、抗菌メカニズムの検討として、塩化亜鉛水溶液を OD_{600}=1.0 に調製した大腸菌に添加し、1 時間接触させた。3 回の遠心分離により余分な Zn^{2+}を除去し、菌体内に含まれる金属イオン濃度を ICP-OES により測定した。

【結果と考察】

Zn 置換率が異なる 4 種の Zn-HAp ナノ粒子を調製した。XRD および FT-IR より、HAp に由来する構造を有していることが認められた。XRD プロファイルから得られた格子定数の算出結果より、Zn 置換率が増加するにつれて、格子定数の減少が認められた。これは、Zn^{2+}イオン半径(0.74Å)が Ca^{2+}(1.00Å)より小さいことによるものと考えられた。また、ICP-OES 測定より Zn は仕込みの約 90%が置換されていた。これらのことから、Zn は HAp 構造中の Ca と置換されていることが示唆された。SEM 観察より、Zn-HAp ナノ粒子は PET シートに単層かつ均一にコーティングされていることが認められた。

抗菌性試験の結果より、Zn-HAp ナノ粒子をコーティングしたシートでは、HAp ナノ粒子をコーティングしたシートと比較して有意な抗菌性が認められた (図 1)。大腸菌と接触することで、接触界面での Zn^{2+}濃度が上昇したことにより抗菌性が現れたと考えられた。また、塩化亜鉛水溶液を大腸菌に添加すると、菌体内の Zn^{2+}が増加し、Mg^{2+}が減少することを見出した。このことから、大腸菌内の様々な酵素や構造中の Mg^{2+}が Zn^{2+}に置換されることで、細胞の酵素反応に攪乱が生じ、抗菌性が認められたと推察された。

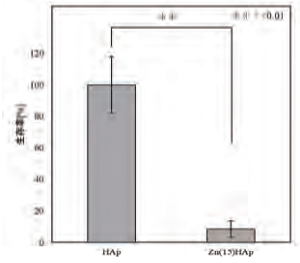


図 1. 大腸菌の生存率

Preparation of Anti-infective bio-nanoceramics and investigation of antibacterial mechanism

Mari Oshita[1], Yasumichi Kogai [2], Toru Uemukai [2], Yoshinao Azuma[1], Tsutomu Furuzono[1]
[1]Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University
[2]SofSera Corporation
Tel: +81-0736-77-3888 , E-mail :furuzono@waka.kindai.ac.jp

1P-093

オリゴプロリン自己組織化集合膜の表面特性と機能評価

[1] 関西大学大学院理工学研究科、[2] 関西大学先端科学技術推進機構
○埜口　友里[1]、平野　義明[1,2]、柿木　佐知朗[1,2]

【緒言】 人工血管や人工心臓の長期埋入時における血栓形成や慢性炎症などの合併症は未だ克服されていない。これらの要因と考えられる、バイオマテリアルと生体組織との接触時に惹起される非特異的なタンパク質吸着、血小板や細胞の粘接着をいかにして防ぐかが重要となる。そこで我々はバイオマテリアル界面に生体不活性（バイオイナ―ト）な生体分子の固定化がその防止に有効と考え、細胞外マトリクスの主要タンパク質であるコラーゲンの分子模倣に着目した。コラーゲンは細胞接着部位とそれ以外の構造骨格部位（$(Gly\text{-}Pro\text{-}Hyp)_n$）で構成されている。構造骨格部位は、細胞接着部位の生理的な機能を阻害することなく細胞と相互作用する場を提供していることから、バイオイナートな性質を有しているであろうと仮説を立てた。本研究では、構造骨格部位のアミノ酸配列をモデル化したオリゴプロリンを固定化した自己組織化膜を作製し、*in vitro* における線維芽細胞の接着性を評価した。

【実験】 鎖長の異なる 2 つのオリゴプロリン($Ac\text{-}Cys\text{-}(Pro)_n\text{-}CONH_2$; n=6 (Pro6) and n=9 (Pro9))を Fmoc 固相法で合成した。金蒸着ガラスを Pro6 もしくは Pro9 の水溶液に 2 時間浸漬し、オリゴプロリン固定化 SAM を作製した。オリゴプロリン固定化 SAM（OP-SAM）表面での化学構造や状態を高感度反射法(IR-RAS)で、水濡れ性を水接触角計でそれぞれ解析した。さらに、F-アクチン可視化マウス胎児線維芽細胞(NIH/3T3-RFP)を OP-SAM 上に播種し、所定時間後に接着形態を観察した。さらにアミノ基を末端に持つ 3-メルカプトプロピルアンモニウムクロリド (MPAC)と Pro6 もしくは Pro9 との混合 SAM を作製し、その表面への NIH/3T3-RFP の接着挙動を評価した。

【結果と考察】 Pro6、Pro9 ともに CD スペクトルで 205 nm 付近に負のコットン効果と 226 nm 付近に正のコットン効果が検出されたことから、コラーゲン骨格構造と同様のポリプロリン II (PP-II) ヘリックスを形成することが分かった。Pro9 は、より強いコットン効果を示したことから、Pro6 よりも安定な PP-II ヘリックスを形成することが分かった。OP-SAM 表面の IR-RAS 解析では、プロリン残基の C-N 伸縮振動に由来する 1438 cm^{-1} のピークと、プロリン残基間ペプチド結合の N-H 変角振動および C-N 伸縮振動に由来する 1310 cm^{-1} のピークがそれぞれ検出された。また、OP-SAM 表面の水接触角は 35°で比較的親水性であった。これらの結果から、オリゴプロリンが金薄膜ガラス表面に固定化できたと考えられる。さらに、OP-SAM 表面に細胞を播種したところ、細胞はほとんど接着しなかった。さらに、濃度を変化させた混合 SAM 上では、オリゴプロリンの割合が増加するにつれて細胞接着が抑制された。これらの結果から、コラーゲンらせん骨格構造を模倣した Pro6 および Pro9 がバイオイナートな生体分子として有用である可能性が示唆された。

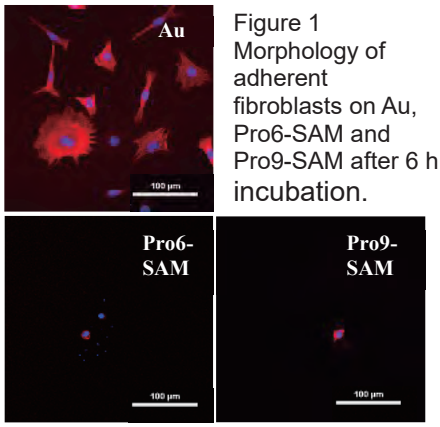


Figure 1 Morphology of adherent fibroblasts on Au, Pro6-SAM and Pro9-SAM after 6 h incubation.

【謝辞】 OP-SAM の作製においてご協力頂きました、関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科 岩﨑泰彦 教授と上田正人 教授に深く御礼申し上げます。

Evaluation of Cell Adhesion Behavior on Oligoproline Self-assembling Monolayers

Yuri NOGUCHI[1], Yoshiaki HIRANO[1,2] and Sachiro KAKINOKI[1,2,*]
[1]Department of Chemistry and Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Materials and bioengineering, Kansai University, Osaka 564-8680, Japan, [2]ORDIST, Kansai University, Osaka 564-8680, Japan
Tel & Fax: 06-6368-3033, *e-mail: sachiro@kansai-u.ac.jp

1P-094

フィラー/マトリックス界面に超分子結合を導入したコンポジットハイドロゲル

[1] 大阪大学大学院工学研究科，[2] 大阪大学大学院理学研究科
○菅原　章秀[1]，麻生　隆彬[1]，高島　義徳[2]，原田　明[2]，宇山　浩[1]

【緒言】 セルロースナノファイバー (CNF) は分子間の強い水素結合により高い結晶性を有しているため、軽量でありながら高い力学強度を示し、複合材料のフィラーとしての利用が期待されているバイオマテリアルである。本研究では、フィラー/マトリックス界面にホスト分子である β-cyclodextrin (β-CD) とゲスト分子である adamantane (Ad) との間で形成されるホスト-ゲスト相互作用による超分子結合が導入された複合材料を作製した。ゲスト分子である Ad は CNF ファイバー表面の水酸基に化学修飾した。ホスト分子 β-CD は、ビニル基を有する誘導体を合成し、主鎖を構成するモノマーと共重合することでマトリックスに導入した。フィラー/マトリックス界面に超分子結合による物理架橋点を有するハイドロゲルを作製し、その力学強度を評価した。

【実験】 粉末セルロースを水中対向衝突法により解繊し、CNF 水分散液を調製した。この分散液の媒体を有機溶媒に置換した CNF 分散液を調製し、CNF の水酸基とアダマンタン誘導体のカルボン酸との脱水縮合反応により、Ad 修飾セルロース (Ad-Cellulose) を作製した (**Fig. 1A**)。さらに、分散液の媒体を水へ置換し、Ad-Cellulose 水分散液を調製した。ビニル基を有する β-CD 誘導体を合成し、フィラー/マトリックス界面に超分子結合を有するハイドロゲルは Ad-Cellulose 存在下で β-CD モノマーと 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) を共重合することで作製した (**Fig. 1B**)。まず、Ad-Cellulose 水分散液に β-CD モノマーを溶解しアダマンチル基に β-CD モノマーを包接させた。そして、マトリックスである HEA およびラジカル重合開始剤を添加し重合を行うことでハイドロゲルを作製した。このゲルを水に含浸することで洗浄を行い、ゲルは平衡膨潤状態に達するまで水に浸漬した。

【結果と考察】 Ad-Cellulose 水分散液に β-CD を添加すると分散液の粘度が上昇した。これは Ad-Cellulose のアダマンチル基に β-CD が包接したことを示している。β-CD の添加により Ad 間の疎水相互作用により凝集した Ad-Cellulose の疎水基が β-CD で被覆されることで水への分散性が向上したため、粘度が上昇したと考えられる。Ad-Cellulose をフィラーとして作製したゲルの外観はセルロースが微分散することで半透明であった。超分子結合を導入したコンポジットハイドロゲルの物性評価は引張試験により行った。超分子結合を有するゲルは β-CD モノマーを添加せずに超分子結合を導入せずに作製したものと比較して破断応力が向上した。β-CD モノマーの添加量の増加にしたがいゲルの破断応力は上昇し、β-CD モノマーを全モノマーの物質量に対し 2.0mol%添加した場合、添加していないゲルのおよそ 1.8 倍の破断応力となった。これは、超分子結合がゲルの物理架橋点として作用していることを示している。超分子結合の阻害剤である 1-admantanamine hydrochloride と β-CD の水溶液をそれぞれ調製し、これらにゲルを浸漬させることで阻害実験を行った。阻害剤浸漬後のゲルの力学強度を引張試験により評価したところ、浸漬前と比較して破断応力が低下した。これは阻害剤がフィラー/マトリックス界面の超分子結合に競争的に包接し、ゲルの架橋点が切断されたためである。これらのことより、フィラー/マトリックス界面に超分子結合を導入することでハイドロゲルの力学強度を向上することが可能であった。

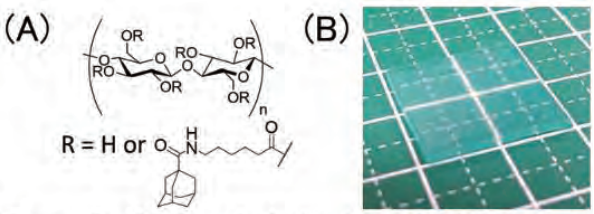


Figure 1. (A) Chemical structure of Ad-Cellulose and (B) Image of the composite hydrogel.

A composite hydrogel possessing supramolecular bonding between filler and matrix

Akihide SUGAWARA[1], Taka-Aki ASOH[1], Yoshinori TAKASHIMA[2], Akira HARADA[2], Hiroshi UYAMA[1]
[1] Graduate School of Engineering, Osaka University [2] Graduate School of Science, Osaka University
Tel: +81-6-6879-7365, Fax: +81-6-6879-7367, E-mail: a_sugawara@chem.eng.osaka-u.ac.jp

1P-095

芯鞘エレクトロスピニング法によるナノファイバー表面へのタンパク質掲示

[1] 福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻，[2] 福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構
○森山 幸祐[1]，末 信一朗[1,2]，藤田 聡[1,2]

【緒言】酵素やタンパク質リガンドを用いたバイオリアクターでは，高効率での反応や，生成物の簡便な分離を可能とするため，タンパク質を表面に固定化した多孔体やマイクロビーズ，膜等の担体材料が使用されてきた。昨今，より比表面積の高い材料としてナノファイバー不織布が着目されている。従来の多孔質担体に比べ，高い空隙率を有しているため，反応液を高流速かつ大容量で流すことが可能となり，バイオリアクター用の担体への応用が期待される。ナノファイバー不織布表面へのタンパク質の固定化については，従来の繊維技術に用いられてきた多ステップから成る表面処理が適用されてきたが，煩雑かつ時間がかかり，繊維材料奥深くの処理が施しにくいという課題があった。工業的利用を想定すると，タンパク質の生理活性を損なわずに，簡便かつ均一に固定化する手法が強く望まれる。そこで本研究では，エレクトロスピニング法によるナノファイバー作製と，繊維表面へのタンパク質の固定化を同時にワンステップでおこなう手法を検討した。エレクトロスピニング法では，高電圧に印加したポリマー溶液をアースされたコレクタに射出することで，均一なナノファイバーを簡便に得ることができる。今回，タンパク質を繊維表面に掲示するために，芯鞘型ノズルを介して芯・鞘それぞれに独立して別のポリマー溶液を射出する芯鞘型エレクトロスピニングを利用した新規な手法を検討した。すなわち，芯材の表面がタンパク質を含む鞘材で覆われた芯鞘ナノファイバーを紡糸することで，紡糸と同時にタンパク質を表面に掲示・固定化することを試みた。基布となるポリマーには酢酸セルロース(CA)を用い，鞘材にはポリビニルアルコール(PVA)を用いた。

【実験】<タンパク質を表面掲示した芯鞘ナノファイバーの作製>芯鞘ファイバーの作成は芯鞘型ノズルを用いたエレクトロスピニング装置（MECC 社）によって作成した。芯層には CA 溶液を，鞘層にはタンパク質およびカルボジイミドを含有する PVA 溶液を用いた。これらの溶液に電界 2.5 kV/cm を印加しながら，鞘 2.0 ml/h，芯 1.0 ml/h で射出し，回転式ドラムコレクタ上で回収することで，タンパク質が表面に掲示・固定化されたナノファイバーシートを得た。
<芯鞘ナノファイバーのキャラクタライズ>得られたナノファイバーの形態観察は光学顕微鏡，走査型電子顕微鏡(SEM)及び透過型電子顕微鏡(TEM)によりおこなった。ナノファイバー表面に掲示されたタンパク質は，抗体を用いた免疫染色をおこない蛍光顕微鏡で観察した

【結果と考察】作製したナノファイバーの TEM 画像(**Fig. 1A**)に示す通り，細いファイバー径を有するファイバーが得られ，その表面に均一な PVA の薄層が観察された。作製したシートを免疫染色し蛍光顕微鏡観察をおこなったところ(**Fig. 2B**)，表面に均一にタンパク質が固定化されていることが示された。免疫染色のプロセスでは水溶液に 1 日以上シートが浸漬されるが，その際もファイバー形態は維持された。以上に示す通り，芯鞘型エレクトロスピニング法を用いたタンパク質の繊維表面への簡便な固定に成功した。本手法は，ナノファイバーを用いたバイオリアクターへの利用可能なリガンド固定化技術として期待される

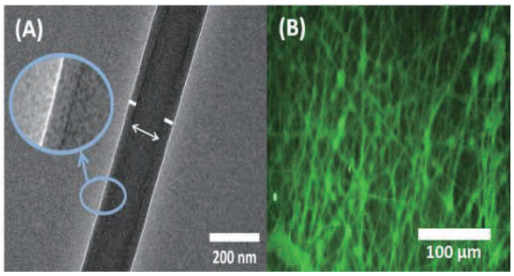


Fig. 2 (A) TEM image of fabricated nanofibers. **(B)** Fluoresent image of protein immobilized fibers.

Display of protein on nanofiber surface by using core-shell electrospinning

Kosuke MORIYAMA[1], Shin-ichiro SUYE[1,2], Satoshi FUJITA [1,2],
[1] Department of Frontier Fiber Technology and Science, University of Fukui [2] Life Science Innovation Center, University of Fukui
Tel: +81-776-27-9969, Fax: +81-776-27-8747, E-mail: fujitas@u-fukui.ac.jp

1P-096

表面酸化反応による生分解性ポリエステルの機能化

1 大阪大学大学院工学研究科, [2]Universiti Sains Malaysia
○呉 威廷 [1], 浅原 時泰 [1], 麻生 隆彬 [1],K. Sudesh Kumar[2], 宇山 浩 [1]

【緒言】ポリ乳酸（PLA）やポリヒドロキシアルカン酸（PHA）などの生分解性ポリエステルは高い生体適合性を有することからバイオマテリアルとして注目を集めている。しかし、これらは汎用性プラスチックと同様に疎水性であるから、生体と接して用いる場合に水分を多く含む軟組織との親和性に課題がある。また、PLA は温度や湿度、pH の影響により加水分解が起こるが、その分解速度を制御する手法の開発が求められている。一方、 PHA の中でもポリ(3-ヒドロキシブチレート-*co*-3-ヒドロキシヘキサノエート) (PHBH）は、PLA と比較すると柔軟性である反面、機械強度が弱いため、応用が制限されている。

本研究では、二酸化塩素ラジカルへの光照射により生じる活性種を用いた新規酸化法を PLA や PHBH などの生分解性ポリエステル表面に適用することで、酸素官能基を導入し、表面の親水性および、細胞親和性の向上を企画した。更に、表面修飾に起因する分解速度の制御や、修飾 PLA と酸化 PHBH を相溶化剤とした材料の複合化による PHA の強度向上を達成する。これにより、医療用プラスチックや電子材料としての用途拡大を実現する。

【実験】PHBH フィルムは、175℃で 10 分間、熱圧縮することで作製した。同様に PLA フィルムを作製した。得られたフィルムを ClO_2 ラジカル存在下、光照射 (LED ランプ：λ＝365 nm)することで酸化処理した。酸化 PHBH および PLA フィルムは、静的水接触角測定により表面濡れを、NMR 測定、XPS 測定により導入官能基組成および量を評価した。

【結果と考察】酸化 PHBH 表面の静的水接触角測定結果を Fig. 1 に示す。酸化時間の延長に伴い接触角が低下し、最小で 55°となったことから、本反応により表面が親水性化することが明らかとなった。また、XPS 測定から、PHBH 表面の酸素原子/炭素原子比（O/C ratio）が増加することがわかった（Fig. 1）。このことから、本酸化処理により PHBH 表面に酸素が導入され、それに伴い親水性が向上することが示唆された。また、^{1}H NMR 測定から PHBH の側鎖に対応するピークの減少が認められ、側鎖の C-H が優先的に酸化されていることが推察された。酸化 PHBH フィルムに対してカチオン性のトルイジンブルーによる染色実験を行ったところ、未処理の PHBH に対して有意に染色できた。このことから、酸化処理した PHBH にアミノ基などのカチオン性官能基をもつ医薬品を担持させるなど、機能性生分解性フィルムなどへの応用も期待される。
同様の酸化処理を PLA に対して行った結果および酸化ポリエステルを用いた複合材料の各種物性を検討した結果についても併せて発表する。

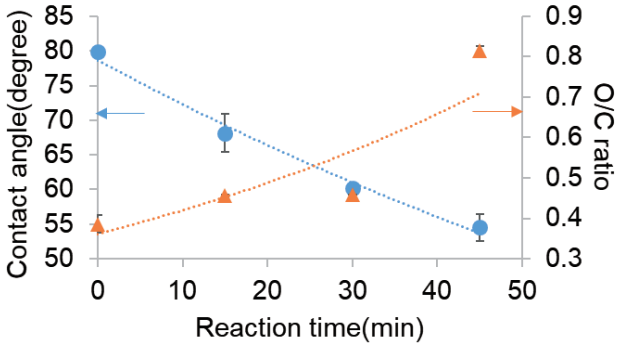


Figure 1. Contact angle and O/C ratio of PHBH surface as a function of reaction time.

Functionalization of biodegradable polyester by surface oxidation

Weiting Wu[1], Haruyasu Asahara[1], K. Sudesh Kumar[2], Taka-Aki Asoh[1], Hiroshi Uyama[1]
[1]Graduate School of Engineering, Osaka University
[2] Universiti Sains Malaysia
Tel: +81-6-6879-7364 , Fax: +81-6-6879-7367, E-mail: w_wu@chem.eng.osaka-u.ac.jp

1P-097

生体模倣ポリマーブラシの自律的構造転移に向けた原子間力顕微鏡による修飾密度の検討

[1] 東京大学大学院工学系研究科，[2] お茶の水女子大学人間文化創成科学研究科
○本間　健太[1]，太田　裕治[2]，秋元　文[1]，吉田　亮[1]

【緒言】刺激応答性高分子を材料表面に修飾した機能性ソフト界面は、温度や光などの外部刺激によって簡便に材料の界面物性を制御することが可能である。一方で、我々は温度応答性高分子 *N*-isopropylacrylamide(NIPAAm)と Belousov-Zhabtinsky(BZ)反応の金属触媒 $Ru(bpy)_3$ からなる自励振動高分子[1]を基板表面に修飾することで自律的に機能を発現する自励振動ポリマーブラシを開発してきた[2,3]。BZ 反応中、$Ru(bpy)_3$ が周期的に価数変化することで基板上の高分子鎖の自律的なコンフォメーション変化が誘起される。さらに、BZ 反応基質の拡散に伴い高分子鎖の伸展した領域が基板表面を伝播する。生体内の繊毛運動に類似したこの現象を利用することで、新規物質輸送や流体制御デバイスへの展開が期待される。本研究では高分子鎖の自律的な構造転移に向けて、表面のナノ構造観察などに広く用いられる原子間力顕微鏡(AFM)を活用し、平衡/非平衡状態において修飾密度がこのソフト界面のコンフォメーション(膜厚)に与える影響について考察する。

【実験】シランカップリング反応によりガラス基板に原始移動ラジカル重合(ATRP)開始剤 2-(*m*/*p*-chloromethylphenyl)ethyltrimethoxysilane)(ClMPETMS) および ATRP 非開始剤 phenethyltrimethoxysilane(PETMS)を異なる比率(ClMPETMS/PETMS = 100/0、50/50、10/90、*v*/*v*%)で共固定した。表面開始型 ATRP により NIPAAm、*N*-3-aminopropyl(methacrylamide)(NAPMAm)を共重合することでガラス基板に poly(NIPAAm-*r*-NAPMAm)を修飾した。最終的にスクシンイミジル基を有する $Ru(bpy)_3$ を NAPMAm のアミノ基と反応させることで、異なる修飾密度の自励振動高分子修飾表面を調製した。修飾高分子を部分的に除去し、AFM で断面をスキャンすることで高分子層の膜厚を測定した。また、基板をそれぞれ Ru^{2+}、Ru^{3+}固定溶液に浸漬し、膜厚膨潤度の温度依存性を調べた。

【結果と考察】調製した 3 種類の自励振動高分子修飾基板(INI-x:x は ClMPETMS の比率)において、一部高分子を除去した際の断面図を AFM により得た(**Fig. 1 a)**)。開始剤導入比率の増加に伴い、高分子層の膜厚も増加した。隣接する高分子鎖同士の立体障害が増すことで、より伸展した構造になったためと考えられる。

さらに、$Ru(bpy)_3$ を還元または酸化状態に固定し、各温度で膨潤度を測定した。**Fig. 1 b)**に INI-100 の結果を示す。いずれの基板においても、$Ru(bpy)_3$ が酸化状態の時は温度上昇に応じて膜厚が減少した。一方、還元状態では測定した温度領域全てにおいて膨潤度は酸化状態のそれ以下であった。酸化/還元状態間で異なる膨潤度を示す温度領域において BZ 反応を生起することで、動的な膜厚振動が期待される。発表当日は、修飾密度が動的な高分子鎖のキネティクスなどにどのように影響するか議論する。

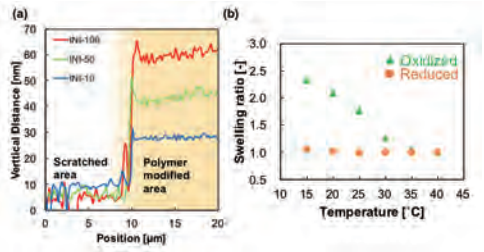


Fig. 1 a) Cross-sectional view of each surface in air obtained by AFM. b) A representative graph of the temperature dependence of swelling ratio (INI-100). $Ru(bpy)_3$ was equilibrated at reduced (Ru^{2+}) and oxidized (Ru^{3+}) states.

【参考文献】[1] R. Yoshida *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5134. [2] T. Masuda *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7468. [3] T. Masuda *et al*., *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 7395.

Toward Autonomous Conformational Transition on a Biomimetic Polymer Brush Surface: Investigation of the Effect of Grafting Density by Atomic Force Microscopy

Kenta Homma[1], Yuji Ohta[2], Aya Mizutani Akimoto[1], Ryo Yoshida[1]
[1]School of Engineering, The University of Tokyo [2]School of Humanities and Science, Ochanomizu University
Tel: +81-3-5841-7112, Fax: +81-3-5841-7112, E-mail: homma@cross.t.u-tokyo.ac.jp

1P-098

表面カルボキシ化ナノセルロースを用いたECM模倣基板上での線維芽細胞の培養

九州大学大学院農学研究院環境農学部門
○畠山　真由美，一瀬　博文，北岡　卓也

【緒言】細胞外マトリックス（ECM）は、単に細胞と細胞の間を埋める充填物ではなく、細胞の分化や増殖に直接影響する重要な生命機能を持つ。そのため、細胞の生体外組織培養への応用に向けて、ECMを模倣した培養基板の開発が盛んに行われている。本研究では、セルロースナノファイバー（CN）を用いることで、ECMの主要成分であるコラーゲンのナノファイバー形状を物理的に模倣した。さらに、CNの結晶表面を2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl（TEMPO）の触媒酸化によりカルボキシ基を規則的に導入することで、同じくECMであるヒアルロン酸のウロン酸型繰り返し構造の模倣を試みた。物理的・化学的にECMを模倣したTEMPO酸化セルロースナノファイバー（TOCN）を用いて細胞培養基板を調製し、マウス由来線維芽細胞NIH/3T3の培養を試みた。

【実験】物理解繊CNのTEMPO酸化は既報に従って行い、次亜塩素酸ナトリウムの添加量でカルボキシ基の導入量を制御した。各TOCN水分散液（0.5 wt%）を200 μLずつカバーガラスに塗布し、室温で24 h乾燥させたものを基板として細胞培養試験に供した。細胞培養試験は、滅菌した細胞培養基板を設置した24-wellプレートにNIH/3T3細胞を50,000 cells/wellとなるように播種し、72 h培養することで細胞接着性を評価した。培養後のNIH/3T3細胞はカルセインAMで生細胞を緑色、エチジウムホモダイマーIIIで死細胞を赤色に同時染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

【結果と考察】含有カルボキシ基量が異なるTOCN基板上でNIH/3T3細胞を72 h培養した結果、カルボキシ基を持たないCN基板およびカルボキシ基量が0.39 mmol/gのTOCN基板では、細胞がスフェロイドを形成し、基板上に弱く接着した（Fig. 1a, 1b）。カルボキシ基量が0.59-0.94 mmol/gのTOCN基板では、細胞接着に不利な親水性表面であるにも関わらず、細胞が基板に接着・伸展しており、基板のカルボキシ基量が多いほど、接着生細胞数が増加した（Fig. 1c, 1d, 1e）。しかし、カルボキシ基量が1.60 mmol/gの基板では細胞が伸展せず、再びスフェロイドを形成した。一般的に播種した培養細胞が基板に接着するためには、まず始めに培地中の血清に含まれるフィブロネクチンやビトロネクチン等の接着性タンパク質が基板に吸着する必要がある。そのため、細胞培養には接着性タンパク質の吸着に適した疎水性基板が用いられるが、本結果から、セルロースナノファイバー界面の親水性のカルボキシ基が細胞接着に直接的な影響を与える可能性と、最適なカルボキシ基量の存在が示唆された。また、NaOHを用いたマーセル化処理で得られる結晶構造の異なるTOCNを用いると、処理前では細胞が接着可能なカルボキシ基量であっても細胞がスフェロイドを形成したことから、物理的因子であるセルロースの結晶形も細胞接着に影響を及ぼす可能性が考えられる。

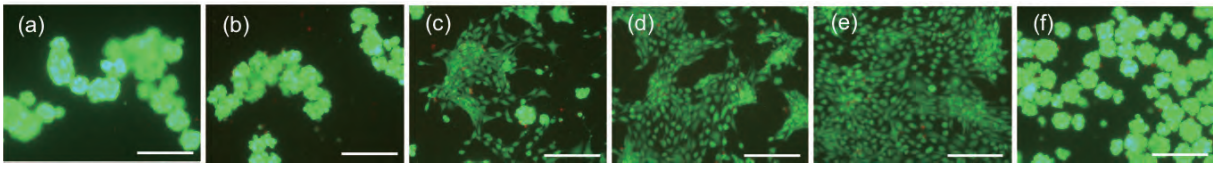


Figure 1 Fluorescence images of NIH/3T3 cells after 72-h incubation on a variety of TOCN substrates with different carboxylate contents: (a) COOH-free CN, (b) TOCN (0.39 mmol/g), (c) TOCN (0.59 mmol/g), (d) TOCN (0.84 mmol/g), (e) TOCN (0.94 mmol/g), and (f) TOCN (1.60 mmol/g). Scale bars: 200 μm.

Fibroblast cell culture on ECM-mimetic substrates prepared using surface-carboxylated nanocellulose

Mayumi Hatakeyama, Hirofumi Ichinose, Takuya Kitaoka
Department of Agro-Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University
Tel: +81-92-802-4665, Fax: +81-92-802-4665, E-mail: tkitaoka@agr.kyushu-u.ac.jp

1P-099

銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルムの抗バイオフィルム活性

[1]熊本大学大学院先端科学研究部，[2]ヤンゴン工科大学化学工学専攻，[3]熊本大学大学院生命科学研究部，[4]大日本塗料株式会社，
○本山　奈菜[1]，Kaung Kyaw[1,2]，市丸　裕晃[1]，原田　彩花[1]，小野　勝彦[3]，津々木　博康[3]，澤智裕[3]，宮澤　雄太[4]，溝口　大剛[4]，新留　琢郎[1]

【緒言】バイオフィルムによる感染症は体内での微生物感染症の 80%以上を占めると言われており、浮遊している細菌と比較して 1000 倍以上の抗菌薬に対する耐性を持っている[1)]。バイオフィルムによる感染症の多くは医療機器関連感染症に関連しており、大きな問題となっている[2)]。一方、銀および銀イオンとその誘導体は、優れた抗菌活性を持ち、薬剤耐性菌に対しても抗菌活性を持つことが古くから知られている。これらのことから、医療機器の表面に銀ナノ粒子をコーティングすることによってバイオフィルムによる感染症の防止が期待できる。そこで本研究では三角形プレート状銀ナノ粒子を含有させた薄層ポリマーフィルムを作製し、抗バイオフィルム活性の評価を行った。

【実験】銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルムは、生分解性ポリマー（ポリカプロラクトン（PCL）、ポリ-L-乳酸カプロラクトン共重合体（PLCL）、 ポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA））を酢酸エチルに溶解させた溶液と有機溶媒分散銀ナノプレート（大日本塗料株式会社）を混合し、ガラスプレート上にスピンコートをすることによって作製した。抗バイオフィルム活性は、銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルム上に形成した黄色ブドウ球菌のバイオフィルムをクリスタルバイオレットによって染色し、595nm の吸光度を測定することによって評価した。

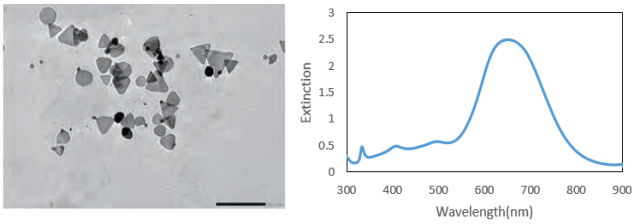


Fig.1　三角形プレート状銀ナノ粒子の TEM 画像と吸収特性

【結果と考察】作製したポリマーフィルムの抗バイオフィルム活性を評価した結果、PCL、PLCL、PLGA 共に、銀に対するポリマーの量が少ないほど高い抗バイオフィルム活性が生じることが分かった(Fig.2)。これはポリマー表面に存在する銀ナノプレートがバイオフィルムの形成を阻害しているためであると考えられる。以上の結果より、本研究で作製した銀ナノ粒子含有薄層ポリマーフィルムは生体内でバイオフィルムの形成を阻害する生体材料として応用が有効であるという可能性を見出した。

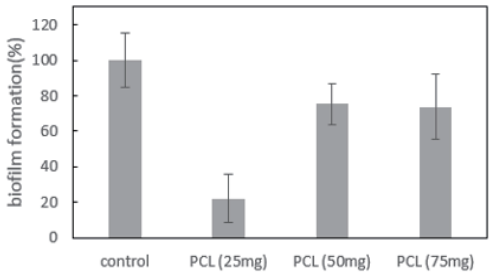


Fig.2　銀ナノ粒子に対する PCL の量を変化させたときの抗バイオフィルム活性

【参考文献】
1) Davies, D.; Nat. Rev. Drug Discov. 2003, 2, 114-122.
2)Ashutosh, K.; Anwar, A.; Mamta, R.; Nasreen, Z. E.; Seyed, E. H.; Int. J. Med. Microbiol. 2017, 307, 481-489.

Anti-biofilm activity of silver nanoparticle-containing thin layer polymer film

Nana Motoyama[1], Kaung Kyaw[1,2], Haroaki Ichimaru[1], Ayaka Harada[1], Katsuhiko Ono[3], Hiroyasu Tsutsuki[3], Tomohiro Sawa[3], Yuta Miyazawa[4], Daigou Mizoguchi[4] and Takuro Niidome[1]
[1] Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University
[2]Department of Chemical Engineering, Yangon Technological University
[3]Department of Microbiology, Graduate School of Medical Science, Kumamoto University
[4]Dai Nippon Toryo Co., Ltd.
Tel: 096-342-3667, Fax: 096-342-3668, E-mail: niidome@kumamoto-u.ac.jp

1P-100

表面親水性を制御したTiへのタンパク質模擬物質吸着挙動

[1]名古屋大学大学院工学研究科，[2]名古屋大学未来材料・システム研究所
○森　祐輔[1]，黒田　健介[2]，興戸　正純[2]

【緒言】生体内に埋植した骨代替材料表面に硬組織が形成する際には，まず表面にタンパク質が吸着し，そのタンパク質を介して，骨の形成に必要な骨芽細胞（様細胞）が接着すると考えられている．しかし，著者らはこれまでに，あらかじめインプラント表面に細胞接着性・非接着性タンパク質を吸着させても，その吸着量が体内埋植後，骨伝導性に影響を及ぼさないことを明らかにしてきた．本研究では，インプラントに吸着するタンパク質の挙動に注目し，ポリペプチドや界面活性剤などのタンパク質を模擬した物質のインプラントへの吸着挙動ならびに模擬物質を事前吸着させた表面へのタンパク質の吸着挙動を調査することにより，タンパク質中のアミノ酸の種類やタンパク質の吸着速度の骨形成に影響をおよぼす因子を明らかにすることを最終目的とした．

【実験】湿式鏡面研磨（表面粗さ Ra/μm < 0.1）したTi(ϕ8 mm)平板及びAu電極(ϕ3 mm)に，180 °Cの蒸留水に3 h浸漬する水熱処理もしくは大気圧プラズマ照射(1 min.)を施した後，室温または240°Cの大気中に最長7 d保持し，水滴接触角(WCA)を制御した．試料表面にタンパク質模擬物質（パラトルモン(分子量約10000)，リボヌクレアーゼ(13000)，リゾチーム(14000)，ミオグロビン(17000)，トリプシン(23000)，エラスターゼ(25000)）およびタンパク質（アルブミン(66000)，カタラーゼ(240000)，フィブロネクチン(440000)）の水溶液(40 μL)を滴下後，37°Cで最長3 d保存し吸着させた．さらにタンパク質模擬物質を吸着させた試料表面へアルブミンを吸着させた．各物質の試料表面への初期吸着速度をQCMによる周波数変化から評価した．また，試料表面の状態をXPS，FT-IR，WCA測定（2 μL）により評価した．タンパク質模擬物質を吸着させた試料をラット脛骨骨幹部に埋植し（14 d），骨伝導能 $R_{B\text{-}I}$（硬組織が生成している部分の合計長さ×100 / 試料の長さ）を求めた．

【結果と考察】試料表面へのタンパク質および模擬物質の初期吸着速度は物質の分子量によって傾向が異なった．分子量の大きいカタラーゼとフィブロネクチンの吸着速度は溶液中での拡散抵抗の影響を受け，試料表面のWCAに影響を受けず，著しく吸着速度が遅いことが分かった．一方，分子量の小さいタンパク質であるアルブミンや模擬物質の吸着速度は試料表面のWCAに強く影響を受けた．分子量の小さい物質は，含まれる親水基が多いほど親水性表面での吸着速度が増加し，疎水基が多い物質ほど疎水性表面での吸着速度が増加した．このことから，物質末端の親水基と疎水基ではなく，物質中のアミノ酸に含有される親水基，疎水基が吸着速度に影響するものと考えられる．また，あらかじめ模擬物質を吸着させた試料へのアルブミンの吸着速度は，WCAが同一の未吸着試料へのアルブミン吸着速度と同程度であった．また，模擬物質吸着試料にアルブミンが吸着する際には，事前吸着した模擬物質は脱離しなかった．また，アルブミンの吸着速度は，事前吸着した模擬物質の量と種類によらず，表面のWCAに依存した．このことから，タンパク質が吸着する際には，表面に存在している物質ではなく，表面のWCAに影響する因子に強く影響を受けていると考えられる．当日は模擬物質吸着試料の骨伝導性についても報告する予定である．

Protein Alternative Substance Adsorption of WCA-controlled Titanium

Yusuke Mori[1], Kensuke Kuroda[2], Masazumi Okido[2]
[1] Department of Materials Process Engineering, Nagoya University
[2] Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University
Tel: +81-52-789-3230, Fax: +81-52-789-3355, E-mail: mori.yusuke@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

1P-101

ナノアパタイトが心筋細胞へのトランスフェクションに与える細胞内取り込みの解明

[1] 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, [2] 東京医科歯科大学生体材料工学研究所, [3] 愛知学院大学歯学部
○小室　博明[1], 笹野　哲郎[1], 山下　仁大[2], 永井　亜希子[3]

【緒言】
ナノ粒子は細胞内へ遺伝物質を運ぶためのベクターとして応用されている。遺伝子デリバリーの最終的な目標は、遺伝子を細胞内に効果的に導入させ、副作用のない遺伝子ベクターの開発である。リン酸カルシウムの一種であるハイドロキシアパタイト($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, HAp) は優れた生体適合性や核酸を安定化させることができるためにベクターとして用いた。低いトランスフェクション効率を改善するために、細胞特異的なエンドサイトーシス経路に着目した。我々の以前の報告では内皮細胞はカベオラ依存のエンドサイトーシスであることを示した。本報告では、心筋細胞によるナノアパタイトのエンドサイトーシス経路を調べた。

【実験】
ナノアパタイトは W/O エマルション法で作製した。作製した試料のキャラクタリゼーションは透過型電子顕微鏡(TEM)、X 線回析装置(XRD)、およびフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)を用いて評価した。マウス心房心筋由来株化細胞の HL-1 細胞にナノアパタイトを接触させた後、細胞毒性は MTT assay にて評価した。 また、HL-1 細胞によるナノアパタイトのトランスフェクション効率はプラスミド GFP を用いて蛍光顕微鏡観察で評価した。さらに、HL-1 細胞の細胞内取り込み経路に対する特異的な阻害剤とマーカーを用いて同様に評価し、主要なエンドサイトーシス経路を評価した。

【結果と考察】
TEM からナノアパタイトは直径約 30 nm の球状形態を示した。XRD の回折ピークは HAp と一致した。FT-IR スペクトルも HAp に存在するイオンを確認した。HL-1 細胞の細胞毒性は用いた濃度範囲内では生じなかった。トランスフェクション効率は以前報告した他の細胞よりも高い値を示した。HL-1 細胞によるナノアパタイトの主要な細胞取り込み経路はマクロピノサイトーシスであることが分かった (Figure 1)。さらにマクロピノサイトーシスマーカーの細胞内の取り込みも観察された。マクロピノソームは他のエンドソームよりも漏れやすいベジクルであるといわれる。それゆえ、トランスフェクション効率は HL-1 細胞のリソソーム内で分解されないために高い値を示すことが示唆された。この結果は、心筋細胞におけるナノアパタイトベースの遺伝子デリバリー開発のための鍵となると期待される。

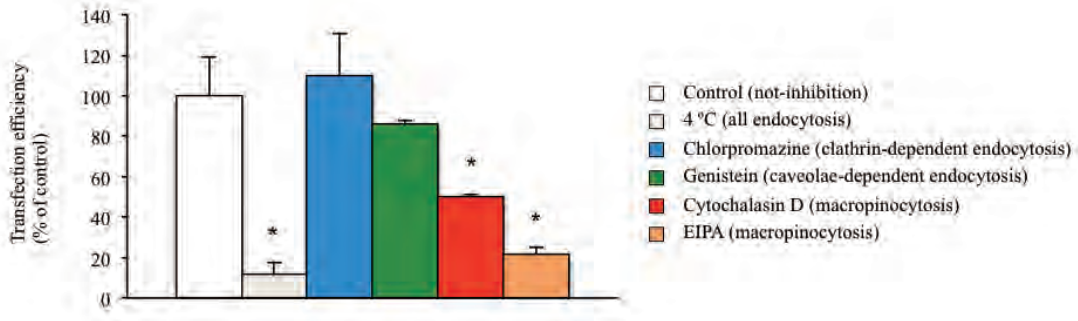


Figure 1. Endocytosis pathway of HAp in the presence of various endocytosis inhibitors in HL-1 cells, respectively (n=4, ∗ : p<0.05 vs control).

Elucidation of intracellular uptake for transfection of cardiomyocytes with nanoapatite

Hiroaki Komuro[1,*], Tetsuo Sasano[2], Kimihiro Yamashita[3], Akiko Nagai[4].
[1] Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
[2] Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
[3] School of Dentistry, Aichi Gakuin University　　*E-mail. hkomuro.cvp@tmd.ac.jp

1P-102

表面処理による多孔質チタンの生体活性に関する研究

大分工業高等専門学校機械工学科
○坂本　裕紀

【緒言】
チタンは軽量で耐腐食性に優れ生体親和性も高いため，歯科インプラントなどの生体材料として用いられるが，骨と直接結合しないことが問題となっている．その解決方法として生体適合性の優れたアパタイトを被覆させる方法とチタンを多孔質化する方法がある．化学的に生体適合性を高める方法として，アルカリ加熱処理やアパタイト核処理がある．本研究では，アパタイト核処理に注目し，多孔質チタンの表面観察及び表面積の影響を調べることで，多孔質チタンの生体活性に対してどれほどの影響を及ぼすか検討した．

【実験】
試料は放電プラズマ焼結法(SPS)によって製作した多孔質チタンの丸棒を使用した．粒度 100μm～125μm の球状純チタン粉末をパルス通電焼結装置により焼結されたものであり，気孔率は約 34%である．本研究では生体内を再現した疑似体液を作製し多孔質チタンのアパタイト析出を確認した．チタンの表面にはアパタイト形成を誘起させる化学処理として，アパタイト核処理を施した．浸漬期間は 1 週間とし体温を想定して 36.5 ºC に保ったインキュベータ内に保持した．なお，pH やイオン濃度の変化を防ぐため，3 日おきに SBF を交換した．3 日間おきに SEM を用いて試料の表面観察をし，結晶粒の形状，析出物の確認を行い，アルカリ加熱処理との比較も行った．

【結果と考察】
表面観察の結果，アパタイト核処理の前処理である硫酸への浸漬により試料の表面に無数の凹凸が確認できた．これにより，非処理の試料に比べ表面積が大きくなり，アパタイトの析出量が多くなると考えられる．アパタイト核処理を施した試料に析出物を確認することができた．また，非処理や硫酸処理のみを行った段階ではアパタイトは確認できなかった．アルカリ加熱処理を施して 1 週間浸漬を行った試料に比べ，アパタイト核処理では 3 日間でチタン粒子表面に十分な量の析出物を確認することが出来た．これにより in vivo 実験を行った際に骨との早期結合，生体活性の向上が期待される．多孔質チタンの表面積とアパタイト析出量との関係を理論的に評価した結果，粒子間の接合面積を考慮しない場合，多孔体の緻密体に対する比表面積 C，粒子 1 個の表面積 p，多孔体中の粒子の数 N，見掛けの表面積 S とすると，チタン粉末の粒度と表面積との関係は以下のようになる．

$$C = \frac{p \cdot N}{S}$$

多孔質チタンに用いるチタン粉末の粒子直径が小さくなればなるほど，理論的な表面積が増加していることが分かった．加えて，アパタイト核処理における硫酸への浸漬により表面が更に凹凸となり，表面積が急激に増加していると考えられる．チタンの表面修飾はその表面酸化被膜に依存する，そのためアルカリ加熱処理を施した試料より，SBF 浸漬におけるアパタイトの析出が促進されたと考えられる．

Study on bioactivity of porous titanium by surface treatment

Yuki Sakamoto
[1]National Institute of Technology, Oita College

Tel: +81-97-552-6879, Fax: +81-97-552-6975, E-mail: ysak@oita-ct.ac.jp

1P-103

医療用架橋 PTFE の耐放射性特性に関する分子レベル解析

[1]滋慶医療科学大学院大，[2]大阪府大工，[3]阪大工
○齋藤寛[1]，古田雅一[2]，松垣あいら[3]，中野貴由[3]，大石雅子[1]，岡崎正之[1,3]

【緒言】
ポリテトラフルオロエチレン PTFE(polytetrafluoroethylene)は、人工血管や縫合糸のような医療材料素材として欠かせない。最近、医療材料の滅菌方法として Co-60 放射線照射は密封した状態で照射可能なことから広く普及しているが、γ線照射された PTFE は、引張強度が低下するとの報告があるものの、放射線滅菌による物性への影響に関しては、未だ十分な検討がなされてはいないのが現状である。特に今回用いる架橋 PTFE は、予め化学的架橋された新規材料で、耐放射性特性については十分に検証されていない。本研究では、医療機器材料安全管理学の観点から Co-60 放射線照射後の架橋 PTFE の物性変化について物理学的、化学的に検証することにした。
【実験】
日立金属株式会社製部分架橋 PTFE（XF1B）および全架橋 PTFE（XF2）を用いた。PTFE のダンベル型 7 号形状（JIS K 6251）試料片（試験部断面積：2 mm x 0.5 mm = 1.0 mm^2（XF1B）; 2 mm x 0.4 mm = 0.8 mm^2（XF2））を作製し、各試料（N = 5）を 0 - 100 kGy にて Co-60 γ線照射し引張試験に供した。放射線照射は、大阪府立大学放射線研究センターにて行った。引張試験機としては、株式会社イマダ製デジタルゲージ ZTS-500N、電動スタンド MX2-500N、及びチャック FC-20 上下 2 個を用いて計測した。クロスヘッド引張速度は 50 mm/min 一定とした。
化学分析用試料として同じく日立金属株式会社製 PTFE 板状試料（15 mm x 15 mm x 0.5 mm（XF1B）；15 mm x 15 mm x 0.4 mm（XF2））を用いた。この板状試料を大阪府立大学放射線研究センターにて Co-60 γ線照射することにより、X 線回折及び Raman 分析に供した。
【結果と考察】
部分架橋 PTFE においては、1kGy の放射線量を照射した後の試料から引張破断強度に低下が認められ、50kGy の放射線照射では引張試験前にすでに 2 本の試料が破壊され、100kGy では 5 本すべての試料が破壊されていた。一方、全架橋 PTFE においては、50kGy 以上の放射線量を照射した後の試料において、ようやく引張破断強度に低下が認められた。
X線回折の結果、部分架橋 PTFE において、回折線ピーク強度は放射線照射により増加する傾向が認められたが、全架橋 PTFE では、放射線照射による回折線ピークの増加は確認できなかった。これらの結果から、部分架橋 PTFE では、放射線照射に伴い結晶化が進んだが、全架橋 PTFE では、架橋により結晶構造の変化が少なかったことが考えられる。
ラマン分析の結果では、部分架橋 PTFE の場合、放射線照射量が大きくなるほど、各散乱スペクトルの強度は大きくなったが、全架橋 PTFE では、散乱スペクトルの強度にほとんど変化はみられなかった。これらの結果から、部分架橋 PTFE の高分子鎖では、放射線照射により低分子に分解されたことが示唆された。
今回使用した架橋 PTFE は、特に全架橋 PTFE の場合に、放射線照射による劣化がかなり抑制されたことが考えられる。非架橋 PTFE を材料として使用している従来の医療器具に比べ、全架橋 PTFE は、放射線滅菌による材質の劣化が抑制されることから、医療機器材料への応用が期待される。

Molecular Level Analysis of Radiation-resistant Properties of Cross-linking PTFE for Medical Use

Hiroshi Saito[1], Masakazu Furuta[2], Aira Matsugaki[3], Takayoshi Nakano[3], Masako Oishi[1], Masayuki Okazaki[1,3]
[1]Graduate School of Health Care Sciences, Jikei Institute
[2]Department of Quantum and Radiation Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University
[3]Division of Materials & Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, Osaka University
Tel: +81-6-6150-1336, Fax: +81-6-6150-1337, E-mail: h-saito@ocmt.ac.jp

1P-104

ラベル貼着剤に含まれる可塑剤成分の PVC 製バッグ保存血液への移行

[1]国立医薬品食品衛生研究所, [2]日本医療研究開発機構
○野村祐介[1], 河上強志[1], 福井千恵[1], 森下裕貴[1,2], 岡本吉弘[1], 葩島由二[1]

【諸元】フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）はポリ塩化ビニル（PVC）製医療機器の代表的可塑剤であるが、生殖毒性等の観点から各国において規制が強化され、代替可塑剤又は非 PVC 製品の使用が推奨されている。近年、我々が実施した新規血液バッグの開発を目指した PVC 製血液バッグのフィージビリティ試験において、血液バッグの材料成分に含まれないフタル酸ジシクロヘキシル（DCHP）が保存血液から検出された。2018 年より DCHP は欧米及び欧州において DEHP 同様に規制対象物質となっているため、本研究では、血液バッグの安全性向上を目的として、DCHP の混入原因を解明すると共に、保存血液中の DCHP 濃度推移について検討した。

【実験】ウシ新鮮血から血漿及び SAGM 加赤血球濃厚液（SAGM/RCC）を調製後、ラベル無し、ラベル有り血液バッグ及びガラスバイアルを用いて、4℃で保存した。陰性対照には、SAGM 溶液を用いた。各試料を保存した血液バッグ及びガラスバイアルを緩やかに振とうし、保存血液を良く混和した後、サンプリングポートを介して、保存開始後 1 日目及び 1-6 週目に各バッグから大気非接触下に採取した。各試料 50 μL を正確にスクリューキャップ付きガラス試験管に採取し、1% NaCl 溶液（1 mL）、ヘキサン（2 mL）及び内部標準物質を添加後、10 分間激しく振とうした。遠心分離により得られた上清（ヘキサン層）を無水硫酸ナトリウムにより脱水した後、常法に従って GC-MS/MS 分析に供して可塑剤溶出量を測定した。また、DEHP-PVC 製血液バッグの各部位から有機溶媒抽出を行い、同様に可塑剤の分析を行った。

【結果及び考察】DCHP は血液バッグ本体及び付属チューブからは検出されず、ラベル貼着部分からのみ検出された。DEHP はラベルの有無にかかわらず、血液バッグに保存したウシ血漿及び SAGM/RCC から同程度検出された。一方、ラベル無し血液バッグに保存したウシ血漿及び SAGM/RCC からは DCHP は検出されず、ラベル有り血液バッグからは経週的に DCHP が溶出していることが判明した。また、陰性対照である SAGM 溶液群及びガラスバイアル保存群からは DEHP 及び DCHP 共に検出されなかった。これらの成績から、血液バッグ用ラベル貼着には DCHP を主成分とした感熱性接着剤が使用されており、加熱貼着時に DCHP が PVC 製血液バッグ素材に移行し、その後、保存血液に溶出していることが示唆された。DCHP は欧米及び欧州において規制対象となっているため、当該可塑剤を含有する感熱性接着剤の PVC 製血液バッグへの使用については、注意が必要であると考えられる。

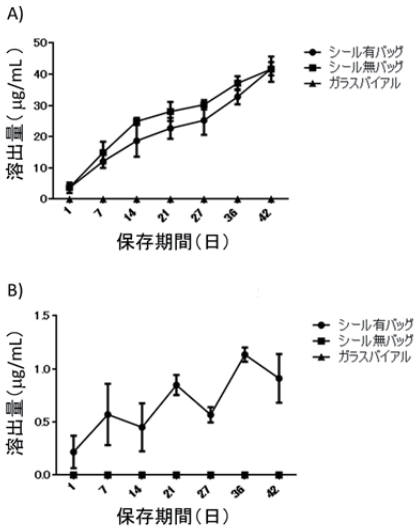


図 1. ウシ SAGM/RCC 中の可塑剤濃度推移. A) DEHP, B) DCHP

Migration of label adhesive plasticizer to blood preserved in PVC bag.

Yusuke Nomura[1], Tsuyoshi Kawakami[1], Chie Fukui[1], Yuki Morishita[1,2], Yoshihiro Okamoto[1], Yuji Haishima[1]
[1] National Institute of Health Sciences, [2] Japan Agency for Medical Research and Development
Tel: +81-44-270-6540, Fax: +81-44-270-6611, E-mail: haishima@nihs.go.jp

1P-105

温度応答型カチオン性くし型共重合体/ペプチド複合体による脂質膜形態の操作

東京工業大学 生命理工学院
○増田 造，落合 拓郎，嶋田 直彦，丸山 厚

【緒言】 生体膜透過ペプチド E5 は中性条件ではランダムコイルであり膜破壊能を持たないが、酸性条件において両親媒性の α-ヘリックスを形成し膜破壊能を発現する[1,2]。当研究室では、カチオン性くし型共重合体 poly(allylamine)-*graft*-dextran (PAA-*g*-Dex)が、静電相互作用により E5 ペプチドと可溶な複合体を形成し、中性条件においても α-ヘリックスの形成と膜破壊能を誘起することを見出した[3]。さらに、E5/PAA-*g*-Dex 複合体を細胞程度の大きさの脂質小胞であるジャイアントリポソームに添加すると、脂質膜のシート形状への構造転移が観察された[4]。このような脂質膜のシート・ベシクル転移を外部刺激により操作できれば、新しい生体材料への展開につながると考えられる。E5/PAA-*g*-Dex 複合体が脂質エッジの親・疎水界面を安定化することにより脂質シートが形成されたと考えられる。そこで本研究では、PAA に側鎖として dextran および親・疎水転移を示す温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)を導入した混合グラフト共重合体(PAND) (**Fig. 1**)を設計し、E5/PAND 複合体による脂質シート形成とその温度変化による操作を試みた。

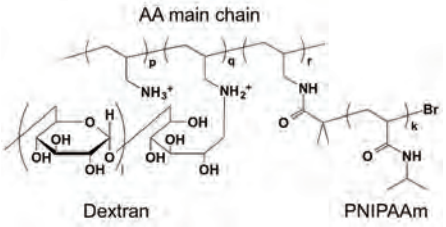
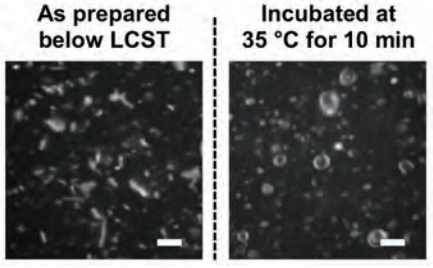


Fig. 1 Chemical structure of the hetero grafted cationic copolymer, PAND.

【実験方法】温度応答型カチオン性くし型共重合体 PAA-*g*-PNIPAAm は既報[5]に従って調製した。さらに還元的アミノ化により dextran を導入することで目的の PAND を得た。調製した共重合体は GPC-MALS, ^{1}H NMR により評価した。蛍光標識したリポソーム(99.6 mol% DOPC, 0.2 mol% PEG2k-DSPE, 0.2 mol% rhodamine labeled-DOPE)に E5 および PAND を添加し、共焦点蛍光顕微鏡観察により脂質膜の形態を評価した。

【結果と考察】調製した共重合体の数平均分子量は 9.0 x 10^4 であり、PNIPAAm, dextran の導入率はそれぞれ 6.2 mol%, 4.5 mol%であった。PNIPAAm の下限臨界溶液温度(LCST)以下においてリポソーム分散液に E5 および共重合体を添加したところ(終濃度: 0.5 mM lipid, 10 μM E5, 600 μM polymer)、各共重合体で脂質シート形成が観察された。E5/PAND 複合体は脂質膜エッジの水・油界面のエネルギーを十分低下させたことでシートが形成されたと考えられる。さらに、形成された脂質シートを LCST 以上である 35 °C で 10 分インキュペートしたところ、混合グラフト共重合体では脂質膜のベシクル形状への復帰が見られた (**Fig. 2**)。すなわち、温度応答性/親水性側鎖の導入率が脂質膜のシート・ベシクル形状制御において重要であることが示唆された。当日はグラフト鎖の導入率が E5 との複合体形成や脂質膜形態制御に及ぼす影響についても報告する予定である。



Fluorescence images of lipid membranes in the presence of PAND. Scale: 5 μm.

1) M. Murata, et al., Ohnishi, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14353. 2) M. Murata, et al., *Biophys. J.* 1993, 64, 724. 3) N. Shimada et al., *J. Controlled Release* **2015**, *218*, 45. 4) N. Shimada et al., in preparation. 5) T. Masuda et al., *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1333.

Control of sheet-vesicle morphology changes of a lipid membrane by thermo responsive cationic comb-type copolymer/peptide complex

Tsukuru Masuda, Takuro Ochiai, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 4259 B-57 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan 226-8501)
Tel: +81-45-924-5762, E-mail: amaruyama@bio.titech.ac.jp

1P-106

フッ素含有高分子の界面水和構造とタンパク質吸着挙動

[1] 九州大学 先導物質化学研究所 ソフトマテリアル学際化学分野, [2]AGC 株式会社商品開発研究所,
[3] Department of Energy Conversion and Storage, Technical University of Denmark
○小口　亮平 [1,2], Jankova Atanasova Katja[3], 山本　今日子 [2], 田中　賢 [1]

【緒言】細胞・タンパク質などの生体分子と高分子表面は水分子を介して接触するため、高分子表面の水和構造は、医療機器の開発において重要な指針となる。ポリ（2-メトキシエチルメタクリレート）（PMEA）は、高分子鎖と中間水的な相互作用を示し分子運動性が比較的高い「中間水」を有し、優れた血液適合性を示すことが知られている[1]。また2 mol%のアミノ基が共重合された（2-ヒドロキシメタクリレート）(HEMA)や、2-7 mol%のフッ素モノマーが共重合されたHEMAはホモポリマー（PHEMA）と比較して、リンパ球およびタンパク質の吸着がそれぞれ抑制されるとの報告がなされている[2]。本報告では、原子移動ラジカル重合（ATRP）を用いて、フッ素元素が共重合されたPMEAを合成し、少量の異種元素が水和構造に与える影響の考察とともに生体応答性の評価を行った。

【実験】分子運動性に着目し、2 種類のフッ素含有PMEA の合成を行った。2,2,2-トリフルオロエチルメタクリレート（3FM）を低分子量で重合したマクロモノマーおよびエステル化された2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-ペンタデカフルオロ-1-オクタノールを開始剤として MEA を重合し、P3FM-*b*-PMEA、F15-*b*-PMEA をそれぞれ得た（Fig. 1）。得られた高分子を純水に十分含浸させ DSC 測定をすることでバルクの水和構造を調べた。また、高分子をスピンコーティングした膜の接触角測定、AFM 測定により高分子／水界面構造をそれぞれ評価した。さらに、フィブリノーゲンと血小板の粘着試験を行うことで、生体応答性を評価した。

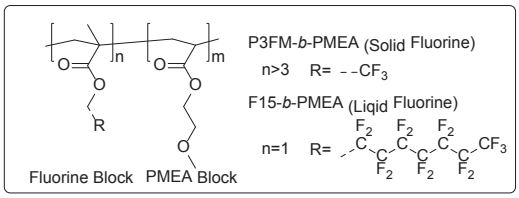


Fig. 1 Chemical structure of fluorinated PMEA

【結果と考察】得られた高分子は、約 2 wt%以上の中間水を有するが、フィブリノーゲンの吸着量に大きな差が認められた。各高分子膜を PBS で浸漬させることでフィブリノーゲンの吸着が相対的に抑制されることも確認され、特に P3FM-*b*-PMEA において顕著であった（Fig. 2）。

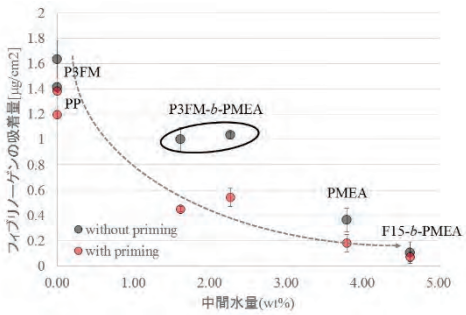


Fig. 2 Protein adsorption of fluorinated PMEA

この結果を考察するため、界面水和構造のダイナミクスの評価を行った。P3FM-*b*-PMEA 膜は水と接触すると徐々に親水化する一方、F15-*b*-PMEA 膜はただちに親水化する。また、AFM 測定より P3FM-*b*-PMEA 膜は PBS で浸漬すると徐々に凹凸構造を形成し、凹部が P3FM、凸部が PMEA の弾性率に近い値を示した。これらの現象は、空気界面で偏析していたフッ素ブロックが、水中で PMEA ブロックに変化していると考えられる。PBS で浸漬させなかった P3FM-*b*-PMEA 膜のフィブリノーゲンの吸着量が高かった理由は、室温以上の *T*g を有する P3FM が水中で PMEA ブロックへの変化を抑制していたためと考えられる。F15-*b*-PMEA が PBS での浸漬前後で吸着量にほとんど変化がなかった理由も、水中での PMEA ブロックへの変化を室温以下の *T*m を有する F15 が抑制しなかったためであると考察される。

以上の結果より、優れた生体親和性界面を構築有するためには、十分な中間水を含む鎖が効率的に水界面に配向する必要があると考えられる。

1) M.Tanaka et al., *Biomacromolecules*, 3, 36 (2002). 2) A. Kikuchi, *J. Colloid Interface. Sci.*, 158, 10 (1993).

Protein adsorption and hydration structure of fluorine-containing synthetic polymers

Ryohei Koguchi,[1,2] Katja Jankova,[1,3] Kyoko Yamamoto,[2] Masaru Tanaka[1]
[1] Soft Materials Chemistry, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University
[2] Research Center, Asahi Glass Co., Ltd.
[3] Department of Energy Conversion and Storage, Technical University of Denmark
Tel: +81-92-802-6238, Fax: +81-92-802-6238, E-mail: ryohei-koguchi@agc.com

1P-107

ポリマーモノリスの形態制御と細胞培養基材への適用

[1] 京都大学化学研究所，[2] 物質・材料研究機構，[3] 山形大学有機材料システム研究推進本部，[4] 山形大学フロンティア有機材料システム創成フレックス大学院，[5] 富山大学大学院理工学研究部
○榊原 圭太[1]，吉川 千晶[2]，干場 隆志[2,3,4]，中路 正[5]，辻井 敬亘[1]

【緒言】連続空孔とポリマー骨格が共連続構造を織りなす高分子多孔体はポリマーモノリスと呼ばれ、高い気孔率と比表面積を反映した応用、例えば、物質分離やクロマト分析、リアクターなど、の観点から、勢力的に研究展開されており、近年では培養基材への適用も検討されている[1)]。その有効な合成法として重合誘起スピノーダル相分離プロセスが注目され、すでに、エポキシ化合物をベースとした熱硬化反応系（逐次反応系）が確立されている[2)]。これまで演者らは、界面化学的な手法によるポリマーモノリスの形態制御に取り組み、表面スキン層の除去、薄膜や粒子の合成、細孔サイズのコントロール、フィラー添加などを実現してきた[3,4)]。これら形態制御された新しいモノリス材料は、細胞培養基材として有望と考える。本発表では、表面スキン層レスかつ異なる細孔径を有するエポキシ系モノリスを培養基材として用いた評価結果、および細孔径と細胞接着性の相関について報告する。

【実験】重合液（孔形成剤 poly(ethylene glycol)（分子量 200）、架橋剤 bis(4-aminocyclohexyl)methane（BACM）、エポキシモノマー1,3-bis(*N*,*N*'-diglycidylaminoethyl)cyclohexane （TETRAD-C）の所定混合液）を厚さ 2 mm となるようにトレイに入れ、所定温度（T = 100, 110, 120, 130 ºC）で 1 時間の重合と洗浄によりモノリス板を得た。次に、細胞培養ウェルプレートのサイズに成型し、表面研磨することでモノリスディスクを作製し、培養基材として用いた。タンパク質の吸着量評価、モデル肝細胞 HepG2 を用い、原子間力顕微鏡による細胞接着力測定、細胞培養実験などを行った。

【結果と考察】モノリスディスクの走査型電子顕微鏡（SEM）画像を図 1 に示す。ディスク表層および内部（断面）が均一な細孔を有することを確認した。T = 100、110、120、130 ºC で合成されたモノリスの平均細孔径はそれぞれ 380、300、170、70 nm と求められ、期待通り、重合温度が高いほど細孔径が小さくなった。ゆえに、重合温度の高いモノリスほど比表面積が増加した。単位面積あたりのタンパク質吸着量はいずれもほぼ同じ値を示したことから、種々モノリスの化学的表面特性はいずれも同等であると判断された。また、HepG2 細胞に対する接着力を測定したところ、いずれもほぼ同等の吸着力を示し、モノリスの微細構造と細胞の初期接着には相関性が見られなかった。しかしながら、培養 1〜4 日の長期的な接着においては接着量や接着形態などに差異が見られた。発表ではこれらの詳細について議論する。

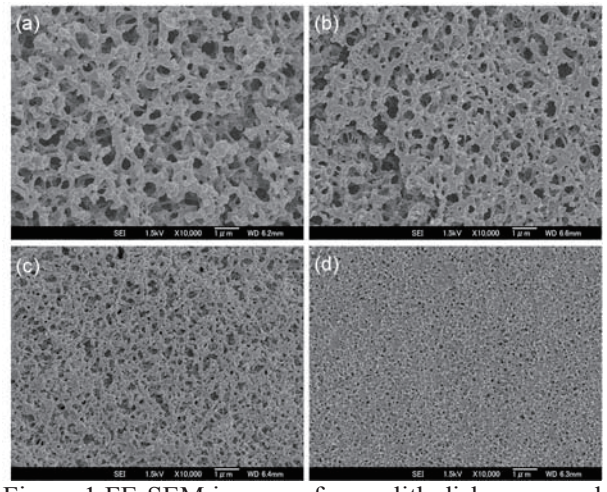


Figure 1 FE-SEM images of monolith disks prepared at (a) 100, (b) 110, (c) 120, and (d) 130 ºC: top surface.

1) A. Löber, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 9138 (2008). 2) N. Tsujioka, et al., *Macromolecules*, **38**, 9901 (2005). 3) K. Sakakibara, et al., *J. Mater. Chem. A*, **5**, 6866 (2017). 4) K. Sakakibara, et al., *Polym. Chem*., **9**, 414 (2018).

Polymer monolith materials with well-defined morphology for cell cultivation

Keita Sakakibara[1], Chiaki Yoshikawa[2], Takashi Hoshiba[2,3,4], Tadashi Nakaji-Hirabayashi[5], Yoshinobu Tsujii[1]
[1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]National Institute for Materials Science, [3]Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University, [4]iFront, Yamagata University, [5]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama.
Tel: +81-773-38-3168, E-mail: sakaki@scl.kyoto-u.ac.jp and yoshikawa.chiaki@nims.go.jp

1P-108

標識酵素を含む各種酵素の長期安定性・高温耐熱性を高めるイオン液体の評価

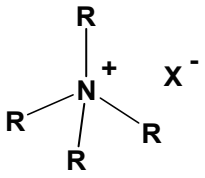
[1] ミヨシ油脂株式会社
○金子　恒太郎[1]，河合　功治[1]

【緒言】酵素は食品や医薬品分野の他、様々な分野において不可欠な材料であるが、非生理的環境下では容易に変性し、その優れた活性を失ってしまう場合が多く、酵素の安定化技術の探索が以前より行われてきた。特に近年は、バイオマテリアルの分野においても酵素、タンパク質を用いた生体構成材料の開発が盛んに行われており、酵素の安定化技術の確立が望まれている。

イオン液体は、不揮発性、高極性、導電性、流動性、低融点等の特異的な物性を有する常温で液体の有機塩であり、その用途は、電気化学や材料科学、反応溶媒、バイオマテリアルなど幅広い分野で注目され、応用検討が行われている。イオン液体のタンパク質保存溶媒への応用についても種々検討が行われている中、これまでに我々は、4 級アンモニウム塩型イオン液体に着目し、検討を行ってきた。その中で、特定官能基を導入したイオン液体が酵素に対する高溶解性、長期安定性、耐熱性を付与することを見出した。

今回の発表では、本イオン液体の酵素安定化剤への応用を目指して、イオン液体濃度（高濃度から低濃度）と酵素安定化との相関、耐熱性の中でも、工業分野で必要とされる～６０℃の高温条件下での安定化効果、免疫染色や ELISA に使用される標識酵素として需要の高いペルオキシダーゼの長期安定性、耐熱性について検討した。

【実験】図 1 に示す各種 4 級アンモニウム塩型イオン液体を、既存の合成法に従って合成した。イオン液体の酵素保存性、耐熱性評価は、次のように行った。イオン液体の 1～86%水溶液及びリファレンス水溶液（バッファーやアルブミン等の各種安定化剤）を調整し、酸化還元酵素、加水分解酵素、ペルオキシダーゼをそれぞれ室温で溶解した。溶解した溶液を 25～60℃の恒温器で一定期間保存し、各期間経過後、保存液中の各酵素の酵素活性を測定することで評価を行った。



Figuer1 イオン液体の化学構造

【結果と考察】各濃度の本イオン液体水溶液に酵素を溶解し、25～60℃で一定期間保存した酸化還元酵素、加水分解酵素の活性（イオン液体による酵素の長期安定化効果）は、低濃度から高濃度のいずれの水溶液濃度、25～60℃の保存温度においても、リファレンス水溶液（バッファーやアルブミン等の各種安定化剤）より高い酵素活性を示した。

さらに、本イオン液体水溶液を用いてペルオキシダーゼの安定化を試みた。溶液・室温保存が困難なペルオキシダーゼは、リファレンス水溶液（アルブミン等の各種安定化剤）の系では安定化効果が低かったが、本イオン液体溶液においては、高い活性保持性を示した。

以上の結果より、本イオン液体が、高温下、いずれの濃度においても各酵素の安定化効果に優れ、特に、安定性の低いペルオキシダーゼに対しても安定化効果を示すことが明らかとなった。これらの結果は、本イオン液体のカチオン、アニオン中の特定の官能基の存在が、酵素の活性保持効果、耐熱性向上に強く影響することを示し、本イオン液体が酵素を始めとする生体高分子の安定化剤への有用性が高いことが示唆された。

Long-term stability and thermo stability of various enzymes including labeling enzyme by ionic liquids

Kotaro Kaneko[1], Koji Kawai[1]
[1] Miyoshi Oil & Fat Co. Ltd.
Tel: +81-3-3602-8791, Fax: +81-3-3690-3542, E-mail: KANEKOK@so.miyoshi-yushi.co.jp

1P-109

生分解性ナノセルロースハイドロゲルの開発と細胞浸潤挙動の評価

[1]物質・材料研究機構　機能性材料研究拠点　バイオ機能分野
○西口　昭広[1]，田口　哲志[1]

【緒言】
高分子の三次元網目構造からなる注入可能なハイドロゲル（インジェクタブルゲル）は、シリンジまたはカテーテルを用いて、組織再生の足場として患部への注入が可能であることから、低侵襲治療に貢献すると期待される。しかしながら、化学反応による架橋を駆動力するインジェクタブルゲルでは、その多くが 2 液混合型であり、細胞毒性や操作の煩雑性が課題である。そこで本研究では、シングルシリンジで注入可能なナノセルロース（NC）からなるチキソトロピー性インジェクタブルゲルを開発することを目的とする（Figure 1a）。NC とは、植物の細胞壁をトップダウン的に微細化することで得られるナノメートルサイズのセルロースコロイドであり、チキソトロピー性を有することで知られる。本研究では、生分解性を付与し、スルホン化された NC（sNC）をゼラチンとコンポジット化することで、高い生体適合性を有する生体機能化インジェクタブルゲルを開発する。また、本ゲルに対する細胞浸潤挙動をラット皮下埋植試験によって評価した。
【実験】
ろ紙粉末を過ヨウ素酸ナトリウムによって酸化することで、アルデヒド化セルロースを作製した。そこに、ピロ亜硫酸ナトリウムを加えることでスルホン化を行い、超音波ホモジナイザーによって解繊することで、sNC を作製した。3 wt%の sNC 溶液（pH=8）と 20 wt%のブタゼラチン（Mw=100 kDa）溶液（pH=8）を当量混合後、静置することで、ハイドロゲルを得た。粘弾性試験によって、周期的なひずみの変化（1%と 1000%）に対する弾性率を測定することで、ゲルのチキソトロピー性を評価した。また、マウス線維芽細胞（L929）を sNC ゲル上に播種し、培養することで細胞接着性を評価した。
【結果と考察】
得られた sNC は、スルホン基間の静電反発によって、ナノメートルスケール（直径：<20 nm、長さ：>1 μm）へと微細化されていた（Figure 1b）。sNC をブタゼラチン溶液と混合することで、数秒以内にゲル化反応が起こり、ハイドロゲルを形成した。一方で、粘弾性試験において、ひずみを 1000%与えた直後でも、貯蔵弾性率が瞬時に回復する挙動が観察されており、sNC ゲルがチキソトロピー性を有していることが示された（Figure 1c）。さらに、アクチン染色の結果より、マウス線維芽細胞は sNC ゲル上に接着、伸展している様子が観察され、ゲルの高い接着性が確認された（Figure 1d）。さらに、ラット皮下への埋植試験において、多くの細胞がゲル内へと浸潤している様子が示された。本ゲルは、インジェクション可能であることから組織再生を促す足場材料として、心筋梗塞治療や脳動脈瘤治療などへの応用が期待される。

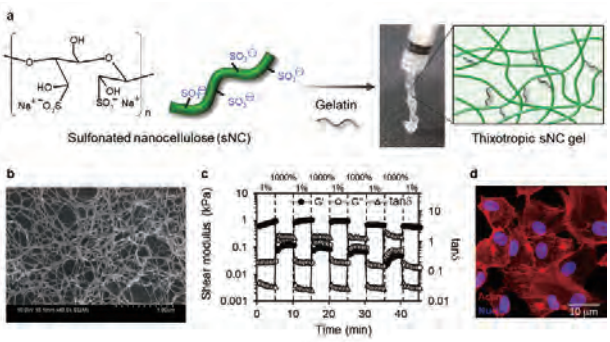


Figure 1. (a) Schematic of preparation of thixotropic, sulfonated nanocellulose (sNC) gel. (b) Scanning electron microscopic image of sNC. (c) Rheological measurement of sNC gels when strain was periodically varied. (d) fluorescence microscopic image of mouse fibroblasts (L929) cultured on sNC gel.

Development of biodegradable nanocellulose hydrogels and evaluation of cell invasion

Akihiro Nishiguchi[1], Tetsushi Taguchi[1]
[1]Biomaterials Field, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science
Tel: +81-29-860-4987, E-mail: NISHIGUCHI.Akihiro@nims.go.jp

1P-110

生理条件で活発に線維化する魚由来コラーゲン

[1] 東京都立産業技術研究センター　バイオ応用技術グループ，[2] 日本電熱株式会社
○畑山 博哉[1]，柚木 俊二[1]，大藪 淑美[1]，成田 武文[1]，杉本 清二[1]，小林 千人[2]，門 雅莉[2]

【緒言】　コラーゲンは生体内環境（37℃、中性）において，自己集合によって細胞接着性を有するナノフィブリルを形成するため，細胞の３次元包埋培養用ゲル基材として広く利用されている．コラーゲン原料としてはブタ・ウシ由来が一般的だが、細胞を包埋したコラーゲンゲルを再生医療に用いる場合，宗教上の理由から魚由来のコラーゲンが要求される国もある．我々は，ウシ・ブタ由来コラーゲンと同等の熱安定性を有する魚由来コラーゲンを探索し，東南アジア原産のバラマンディ（*Lates calcarifer*）の鱗から得られるコラーゲン（BC）が 37℃において活発に線維化することを見出した．本発表では，BC のキャラクタリゼーションおよび３次元包埋基材としての有用性について報告する．

【実験】　ペプシンを含有した 0.5M 酢酸中でバラマンディ鱗を撹拌し，コラーゲンを抽出した．常法の塩析および透析により精製 BC を得た．比較として，市販のブタ腱由来コラーゲン（PC），市販の魚鱗由来コラーゲン（FC）を用いた．酸性コラーゲン水溶液を 10℃から 50℃まで昇温した時の 221 nm における円二色性（CD）を追跡し，変性温度を決定した．線維形成能を評価するため，回転型レオメーターを用いて，10℃から 37℃まで昇温した場合の中性コラーゲンゾル（濃度 0.27%）の貯蔵弾性率（G′）を追跡した．さらに，温度を 37℃から直線的に昇温し，線維ゲルの熱安定性を評価した．線維形成能の評価に用いたものと同様の中性コラーゲンゾルを加温して線維化させ，走査型電子顕微鏡（SEM）により線維構造を観察した．酸性コラーゲンの超遠心分析により，コラーゲンのモノマーを超える分子量成分（非アテロ化成分）の含有量を決定し，コラーゲン精製度について評価した．

【結果と考察】　再生医療用途として有用なPCと同様に，BCは37℃で線維を形成した．分子状態でのBCの変性温度はPCよりも低いが，中性のBCゾルは37℃に至る前に鋭いG′の上昇を示し（図１），白濁した熱安定性の高い線維ゲルを形成した．ゲル化がコラーゲンの線維化によるものであることがSEM観察から示された．BCゲルのG′は37℃昇温直後にプラトー（108 Pa）に達し，同濃度のPCゲルに匹敵する硬さ（118 Pa）を示した（図１）．更にレオメーターの温度を上昇させたところ，BCゲルの軟化は47℃付近まで生じなかった．一方，FCの変性温度はBC分子の変性温度（約36℃）と同様にもかかわらず，37℃における線維形成能は低かった．

BCが熱的に安定な線維ゲルを形成できた理由については未解明だが，アミノ酸組成や線維化の核が原因ではないことが示唆された。アミノ酸組成分析によりBCとFCで差異がみられず，超遠心分析によりBCの分子量分布はほぼモノメリックであることが確認された．BCの優れた線維化能および線維の熱安定性がどのような構造因子によるものかを明らかにすることが今後の研究課題である．

以上により，BCは，PCと同様に再生医療用コラーゲン原料としての利用が期待される．今後は，BCをゲルマトリクスとした細胞の包埋培養を実証する．

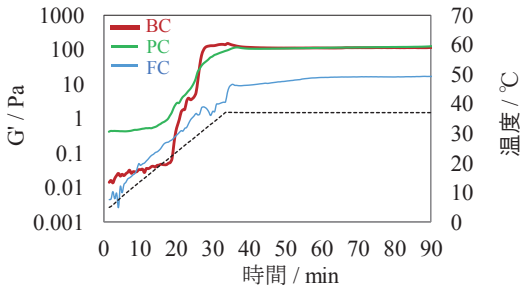


図１　生理温度への昇温による中性コラーゲンゾルの貯蔵弾性率の変化　（図中の破線は温度変化を示す.）

A fish collagen with a capacity to form fibrils actively under physiological condition

Hirosuke Hatayama [1], Shunji Yunoki [1], Yoshimi Ohyabu [1], Takefumi Narita [1], Kiyoji Sugimoto [1], Kazuto Kobayashi [2], Men Yali [2]
[1]Biotechnology group, Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute,
[2] NIHON DENNETSU CO.,LTD.
Tel: +81-3-5530-2671, Fax: +81-3-5530-2629, E-mail: hatayama.hirosuke@iri-tokyo.jp

1P-111

In vitro 皮膚刺激性試験に用いる再構築ヒト表皮モデルの性能評価

[1]国立医薬品食品衛生研究所　医療機器部
○加藤 玲子，小森谷 薫，宮島 敦子，蛯島 由二

【緒言】医療機器の刺激性は動物を用いた皮膚刺激性試験、皮内反応試験、眼刺激試験等の *in vivo* 試験により評価されているが、近年、ISO/TC194/WG8 において 2 種類の再構築ヒト表皮(RhE)モデル(EpiDerm™ EPI-200 RhE モデル(EpiDerm)、SkinEthic™ RHE モデル(SkinEthic))を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法の性能を検証する国際ラウンドロビンスタディ(RRS)が行われ、その有用性が示された。一方、我々は RRS と同一の被験物質を用いて国産 RhE モデルである LabCyte EPI MODEL(LabCyte)の性能検証を行い、他の 2 種の RhE モデルと同様に医療機器の皮膚刺激性評価に適用できることを示した（第 39 回日本バイオマテリアル学会大会：2P-033）。RRS プロトコルでは、陽性対照物質として 1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)が用いられており、各 RhE モデルで程度の差はあるが、組織損傷が激しく、洗浄時に剥離・破損してしまうことが報告されていたことから、本研究では、各 RhE モデルで陽性対照として許容できるより最適な SDS 濃度の検討を行った。また、当試験法は細胞生存率を指標として細胞の損傷を評価することで間接的に刺激性の有無を判定していることから、刺激性と直接関連する炎症性サイトカイン(IL-1α)の発現挙動を追跡し、3 種の RhE モデルで比較検討した。
【実験】被験物質としては、0.05%～1% SDS を使用した。各濃度の被験物質を 18 時間暴露後、(D)PBS で十分洗浄し、後培養することなく、直ちに MTT 法を用いて細胞生存活性を測定した。陰性対照としては、(D)PBS を用いた。RRS プロトコルに従い、陰性対照に対する被験物質の相対生存率を算出し、相対生存率 50%以下を刺激性陽性と判定した。培養上清中の IL-1α量は ELISA 法にて測定し、陰性対照の発現量を 1 として相対比（S/N 比）を算出した。
【結果と考察】MTT アッセイの結果、EpiDerm の相対生存率は 0.25% SDS で 17.5%となり、それ以上の濃度では 3%以下に低下した。SkinEthic の相対生存率は 0.05%SDS で 32.6%であり、それ以上の濃度では 3.5%以下となった。また、LabCyte では 0.075% SDS で相対生存率が 42.8%となり、それ以上の濃度では 5.5%以下であった。組織損傷に係る肉眼所見として、EpiDerm は 1% SDS、SkinEthic は 1%及び 0.5% SDS の一部で剥離が観察された。LabCyte は 1% SDS で組織の損傷が激しく洗浄過程で原型を止めている組織がなく、0.5%及び 0.25% SDS の一部でも隔離が観察された。以上の結果から、EpiDerm、SkinEthic 及び LabCyte では、それぞれ 0.25%、0.075%及び 0.1%以上の SDS 濃度があれば陽性対照として十分であるが、ハンドリングも考慮した場合、陽性対照として 3 種の RhE モデルに共通して適用できる SDS 濃度は 0.5%であることが判明した。IL-1α産生量は、3 種のモデルともに低濃度域では SDS の濃度依存的に増加したが、高濃度域では一定濃度を境に徐々に減少した。EpiDerm は 0.25%、SkinEthic 及び LabCyte は 0.1% SDS 刺激時に最も高い IL-1α誘導能を示した。その際の IL-1α産生量は、それぞれ約 370 pg/mL、500 pg/mL 及び 940 pg/mL であり、陰性対照に対する S/N 比は約 48 倍、約 51 倍及び約 1620 倍であった。一方、EpiDerm の場合、0.05%、0.1%及び 0.125% SDS 刺激時の相対生存率は、いずれも 90%前後であったが、IL-1α産生量は濃度依存的に増加し、S/N 比がそれぞれ 5 倍、7.5 倍及び 14.6 倍となった。LabCyte にも同様の傾向が認められ、0.05%及び 0.625% SDS 刺激による相対生存率は 95%以上であったが、S/N 比は 85 倍及び 290 倍に増加した。これらの結果から、被験物質の相対生存率が 50%以上あった場合でも二次マーカとして炎症性サイトカインの発現量を測定することで、被験物質の刺激性の有無をより正確に判定できることが明らかとなった。

Performance evaluation of reconstructed human epidermal models for *in vitro* skin irritation test

Reiko Kato, Kaoru Komoriya, Atsuko Miyajima, Yuji Haishima
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences
Tel: +81-44-270-6544, Fax: +81-44-270-6545, E-mail: r-kato@nihs.go.jp

1P-112

細胞低接着性コラーゲンによる神経細胞の活性化と組織再生機能の検証

[1]近畿大学生物理工学部，[2]藍野大学中央研究施設，[3]神戸医療産業都市推進機構医療イノベーション推進センター
○國井沙織[1]，兼清健志[2]，中野法彦[2]，加藤暢宏[1]，尾前 薫[3]，井出千束[2]，森本康一[1]

【緒言】神経損傷における再生医療において中枢神経の再建は未だ困難である．例えば，自家神経束の移植や自家幹細胞移植などが試みられているが，必ずしも良好な治療法ではない．その主な理由として，切断された神経束は再生能力が低く，ギャップジャンクションの形成が著しく低下することが挙げられる．よって，断裂神経束を再建する再生医療において，神経細胞の増殖と誘導，分化，神経突起の伸長，ジャンクションを早期に形成させる材料開発とその検証が急務である．我々はこれまでに培養細胞が自発的に接着型スフェロイドを形成し，骨分化誘導を促進する細胞低接着性コラーゲン（LASCol, Low Adhesive Scaffold Collagen）を開発し（2017 年度本大会で発表），LASCol にはアテロコラーゲンと異なる特徴があることを明らかにしてきた．そこで本研究では，1) LASCol のゲル化特性をレオロジー特性評価装置により測定し，2) ラット海馬組織から回収した神経細胞を LASCol 塗布培養皿で培養して神経突起伸長細胞の増加、突起形成速度の高速化、突起長の増大を調べた．さらに，3) ラット脊髄損傷モデルを用いた動物実験で LASCol ゲルを損傷部に注入し，*in vivo* での神経再生の初期治癒効果を検討したので報告する．
【方法と材料】LASCol ゲルの作製と特性：ブタ皮膚由来アテロコラーゲンから LASCol を調製した．LASCol 溶液を 37°C に保温することでゲル化させ，すぐさまレオメーター（HAAKE MARS III）にて測定開始 30 分後の貯蔵弾性率（G’）を測定した．細胞実験：LASCol，アテロコラーゲン，ポリ-L-リシンを塗布したチャンバースライドに，ラットの海馬由来神経細胞あるいは大脳由来アストロサイトを播種し、細胞形態を経時的に観察した．次に，神経細胞の神経突起の経時的変化を抗β-tubulin 抗体を用いた免疫化学染色により観察した．さらに，抗 ALDH1L1 抗体を用いた免疫化学染色によりアストロサイトの各足場への接着能と増殖能を調べた．動物実験：雌の 6 週齢の SD ラットを麻酔下で標準的なニューヨーク大学の重量落下装置（W=10 g，H=7.5 cm，1 回）により圧挫損傷モデルを作製した．損傷直後に LASCol ゲルあるいは PBS を脊髄損傷部に注入した．注入 8 日後の脊髄組織標本を作製し，GFAP とリン酸化 GAP-43 に対する抗体を用いて免疫組織染色により陽性細胞を観察した．
【結果と考察】LASCol ゲルの作製と特性：14 mg/mL までのブタ皮膚由来 LASCol ゲルを調製して貯蔵弾性率を測定した結果，G’（t=30 min）は LASCol 濃度に依存して増大した．細胞実験：LASCol 上で培養した神経細胞は，抗β-tubulin 抗体で染色された神経突起が著しく伸長し、また神経細胞の生存率が増大することが明らかになった．一方，アストロサイトは LASCol 上では他の足場と比較して接着する細胞が極端に減少し，増殖率が抑制された．動物実験：圧挫損傷脊髄に注入した LASCol ゲルでは，リン酸化 GAP-43 が陽性な細胞集団が観察され，損傷部位に内在性の神経細胞から再生軸索が伸びてきていることが示された．よって，脊髄損傷が生じたラットは LASCol ゲルの注入によって、損傷部分に神経細胞が誘導されることが示唆された．
【謝辞】本研究は，AMED 橋渡し研究戦略的推進プログラム（大阪大学拠点，A-75（K.M.））と JST A-STEP シーズ育成タイプ（K.M.）の研究助成で得られた成果です．コラーゲン材料をご提供いただきました新田ゼラチン株式会社に感謝いたします．

Evaluation of Low Adhesive Scaffold Collagen gel for activation and regeneration of nerve tissue

Saori Kunii[1], Kenji Kanekiyo[2], Norihiko Nakano[2], Nobuhiro Kato[1], Kaoru Omae[3], Chizuka Ide[2], Koichi Morimoto[1]
[1]Department of Genetic Engineering, Kindai University, [2] Central Biomedical Laboratory, Aino University School of Health Science, [3]Translational Research Center for Medical Innovation
Tel: +81-736-77-3888, Fax: +81-736-77-4754, E-mail: morimoto@waka.kindai.ac.jp

1P-113

細孔形成能を有する 3D プリンタ用ポリ乳酸フィラメントの開発

広島大学大学院医歯薬保健学研究科　生体材料学
○平田伊佐雄，加藤功一

【緒言】

近年，熱融解積層方式の 3D プリンタを用いた硬組織再建用スキャフォールド作製の研究が急速に進んでいる．しかしながら，その造形材であるフィラメントはポリ乳酸(PLA)，乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)など単一組成の生体分解性樹脂しか用いられておらず，スキャフォールドの機械的特性・骨伝導能・細胞接着性・生体内分解性などの特性を制御する方法が限定されている．

本研究の目的は，生体分解性スキャフォールド造形用フィラメントのバリエーションの拡大を目的とし，熱溶融混練法を用いた粉体混合を行うことにより，単一組成フィラメントと比べて様々な特性を有する 3D プリンタ用フィラメントを開発した．組織工学用スキャフォールドの素材として、生体分解性高分子である PLA は研究・開発に多く用いられている．しかし，PLA は生体分解速度が遅く機械的強度も高いため，これらの特性を制御する必要がある．PLA の機械的強度・生体分解速度は，内部に細孔を導入することにより調整できると考えられる．今回，内部への細孔の導入を目指した 3D プリンティング PLA フィラメントの作製について報告する．

【実験】

45～90 μm に整粒した塩化ナトリウム(NaCl)と 1.0 mm 以下の PLA ペレットを，ボールミル・クラッシュミルと篩を用いて調製した．これらの粉砕物を二軸押出機で混練し，混練ペレットを作製した．作製した混練ペレットから直径 1.75 mm の NaCl 混練 PLA フィラメントを，一軸押出機を用いて作製した．NaCl 混練 PLA フィラメントを 3D プリンタに装填し，NaCl 混練 PLA の 3D 印刷体を作製した．

NaCl 混練 PLA フィラメント・印刷体を水に 1～7 日間浸漬し，内部の NaCl の溶出重量を測定した．また，NaCl 混練 PLA のペレット，フィラメント，3D 印刷体の内部の NaCl を X 線 CT にて観察した．

【結果と考察】

NaCl は水に溶解するため、NaCl 混練 PLA フィラメントで作製した 3D 印刷体を水に浸漬すると NaCl 微粒子は溶解し、細孔が導入されると予想される。このフィラメントで作製した 3D 印刷体を水に浸漬することにより，浸漬前は透明性があった印刷体は白濁した．また，浸漬後は，印刷体の重量は顕著に減少した．これより，印刷体内の NaCl 微粒子が溶解し細孔となったため光散乱の度合いが変化したものと思われる．また，これらの 3D 印刷体を X 線 CT で観察した結果（図 1），印刷体表面の NaCl は水浸漬後，速やかに溶出し細孔が形成されていた．また，断層像から印刷体内部の NaCl は 7 日間の水浸漬によって，ほぼすべて溶出したことがわかった．

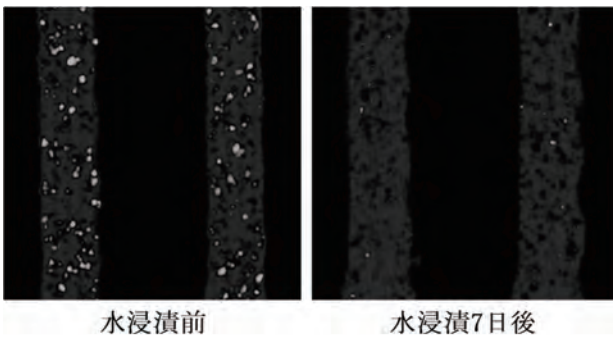


図 1　3D 印刷体の X 線 CT 断層像

NaCl 混練 PLA フィラメント作製時に NaCl の混合量を変化させることにより，3D 印刷体の空隙率を制御することが可能である．これにより造形物の機械的性質・骨伝導能・細胞接着性・生体内分解性などの特性を制御・調整できるものと期待できる．

Development of micropore-forming polylactide filaments for use in 3D printing

Isao Hirata, Koichi Kato
Department of Biomaterials, Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University
Tel: +81-82-257-5648, Fax: +81-82-257-5649, E-mail: isao@hiroshima-u.ac.jp

1P-114

創傷被覆材への応用を指向したシルクフィブロインの構造制御と細胞との相互作用解析

[1]奈良女子大学　生活環境学部，[2]国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部，3 農業・食品産業技術総合研究機構　生物機能利用研究部門，[4]信州大学　繊維学部
○橋本　朋子[1]，道法　志帆[1]，大槻　直美[1]，佐野　奈緒子[1]，山岡　哲二[2]，亀田　恒徳[3]、玉田靖[4]、黒子　弘道[1]

【緒言】シルクフィブロインは長く外科用縫合糸としての実績をもち、さらに近年では、組織再生の足場材料としても広く研究されている。このシルクフィブロインのタンパク質二次構造は、強度など材料としての物性のみならず、機能性分子の固定化にも寄与すると考え、われわれは、これまでに、創傷被覆材への応用を指向して二次構造変化を利用した機能性ペプチドのシルクフィブロインへの固定化を試みている。さらに、表面近傍の二次構造の含有率やその二次元的な分布が、材料上の細胞の様々な機能に影響すると考え、本研究では、βシートやヘリックス構造などのタンパク質二次構造含有率が異なるシルクフィブロインを作製し、フィルムの表面近傍の二次構造の含有率やその分布が増殖や遊走などの細胞の挙動に与える影響について調べた。

【実験】既報に従い調製したシルクフィブロイン水溶液を基材に滴下し室温または 50℃で乾燥させた後、各種アルコールの 80%水溶液処理を組み合わせ、種々のフィルムを得た。Attenuated Total Reflection（ATR）法による FTIR スペクトル測定、顕微ラマンスペクトル測定により、シルクフィブロインフィルム表面近傍のタンパク質二次構造含有率、および二次構造含有率の分布について調べた。続いて、マウス繊維芽（NIH/3T3）細胞を用いて、各フィルム上での細胞増殖評価、および遊走能評価のためのスクラッチアッセイを行った。

【結果と考察】図 1 にアルコールとしてメタノールを用い作製したフィルムの ATR-FTIR 測定による構造解析の結果を示す。フィルム作製時の乾燥温度（RT、50）、および 80%メタノール水溶液を用いた処理の有無（Me、Non）の組み合わせにより、RT/Non、RT/Me、50/Non、50/Me と表記している。得られた結果より、乾燥温度やアルコール処理の有無、またアルコールの種類によって異なる二次構造含有率を有するフィルムの作製が確認できた。また、顕微ラマンのマッピング測定にて解析した結果、フィルム表面近傍における二次構造の含有率が二次元的に不均一となる傾向が示された。さらに、各フィルムと NIH/3T3 細胞を用いた評価結果より、フィルム表面近傍の二次構造含有率が、細胞の増殖や遊走に影響を与える可能性が示唆された。

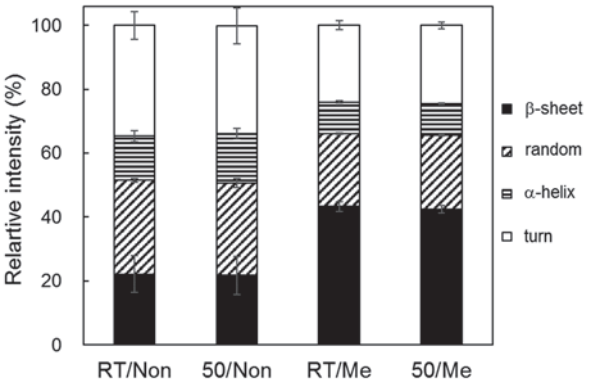


Figure 1. Relative intensity of secondary structures in silk fibroin films. (n=5)

Secondary structure and interactions with fibroblast of silk fibroin films for wound dressing applications

Tomoko Hashimoto[1], Shiho Douho[1], Naomi Otsuki[1], Naoko Sano[1], Tetsuji Yamaoka[2], Tsunenori Kameda[3], Yasushi Tamada[4], Hiromichi Kurosu[1]
[1]Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University, Kitauoya-Nishimachi, Nara 630-8506, Japan, [2]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, [3]National Agriculture and Food Research Organization, 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan, [4]Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan
Tel & Fax: +81-742-20-3462, E-mail: hashitomo@cc.nara-wu.ac.jp

1P-115

細胞接着性ペプチド固定化リン脂質ポリマーブラシ表面における細胞接着挙動解析

東京大学大学院工学系研究科
○井上　祐貴、石原　一彦

【緒言】バイオデバイスや医療デバイスを適切に創製する際には、マテリアル表面における細胞接着を使用環境や目的に応じて制御することが求められる。これには、マテリアル表面上の細胞接着性ペプチドと細胞膜上のレセプタータンパク質との相互作用が、細胞接着挙動や接着細胞の機能に与える影響を明確にすることが重要である。これを実現するためには、細胞接着性ペプチドの存在状態が明確な細胞足場環境が必須である。マテリアル表面で形成されるタンパク質吸着層の構造は水中で動的に変化しており、細胞接着性ペプチドがタンパク質内のフレキシブルなドメインに存在する場合もある。これらのことは、細胞接着性ペプチドの微小な変位や可動性が、細胞接着に大きな影響を与えることを示唆する。そこで本研究では、細胞接着性ペプチドの配置が明確な表面により、その動的特性が細胞接着挙動に与える影響を定量的に解析することを目的とする。このため、ナノオーダーで明確なポリマーブラシ構造の末端に細胞接着性ペプチドが固定化された表面を作製した。また、細胞接着性ペプチドの特性が細胞接着挙動に与える影響を高感度で解析するため、タンパク質吸着を完全に排除するリン脂質ポリマーブラシ層を用いた。特に、ポリマーブラシ層のグラフト密度によって、末端の細胞接着性ペプチドの可動性を制御した。

【実験】原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始基およびヒドロキシ基を有するアルカンチオールを用いて、異なる開始基密度を有する表面を金基板上に作製し、表面開始型 ATRP 法により、重合度 400 の poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC)ブラシ表面を作製した。続けて、Huisgen 環化付加反応を利用して、PMPC 鎖の末端に環状 RGD (cRGD)を固定した。このとき、細胞接着性の低い RDG を用いることで、cRGD の固定化密度を制御した。エリプソメーターを用いて PMPC グラフト層の乾燥膜厚を測定し、グラフト密度を解析した。エネルギー散逸型水晶振動子マイクロバランス法(QCM-D)を用いて、グラフト層形成に伴うエネルギー散逸変化(ΔD)および共振周波数変化(Δf)を測定し、ΔD/Δf 値により表面の粘弾性を評価した。10%ウシ胎児血清(FBS)溶液からのタンパク質吸着量を QCM-D 測定によって定量した。ヒト子宮頸ガン(HeLa)細胞を用いて、播種 1 時間後の接着細胞数をカウントした。細胞播種密度を 2.0×10^4 cells/cm^2 とした。

【結果と考察】エリプソメーターによる膜厚測定から、開始基濃度を変化させることにより、グラフトした PMPC 鎖の密度を 0.01-0.18 chains/nm^2 の範囲で制御できた。QCM-D 測定の結果、グラフト密度の増加に伴い、ΔD/Δf 値は減少した。PMPC 鎖がパッキングされるにつれて、水中での PMPC 鎖の可動性が低下したため、ポリマー層の粘弾性が低下したと考えられる。作製した表面への FBS からのタンパク質吸着量は、グラフト密度によらず 30 ng/cm^2 以下であった。さらに、ブロモ変換もしくは RDG 末端の PMPC グラフト表面には細胞が全く接着しなかったのに対して、cRGD 末端の PMPC グラフト表面には細胞接着が観察された。これらの結果から、末端に導入した細胞接着性ペプチドのみにより細胞接着を誘起できる表面を構築できた。Fig. 1 に示すように、異なる ΔD/Δf 値を有する cRGD 固定化 PMPC グラフト表面においては、ΔD/Δf 値の増加に伴い細胞接着密度が増加した。この結果から、細胞接着性ペプチドの可動性が高い表面で、膜タンパク質との相互作用が有利となり、より多くの細胞接着性ペプチド－膜タンパク質結合が生じていることが示唆された。

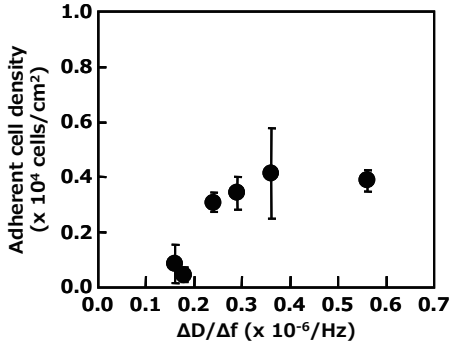


Fig. 1. Relationship between adherent cell density and ΔD/Δf value at cRGD-immobilized PMPC grafted surfaces.

Cell adhesion on cell adhesive peptide-immobilized phospholipid polymer brush surface

Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara (Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan) Tel: +81-3-5841-7124, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: inoue@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

ポスター発表

第 2 日: 11 月 13 日（火）

2P-001

ペプチドアンカーを介した ePTFE 基材への細胞接着性リガンドの安定な直接固定化

[1] 関西大学化学生命工学部，[2] 大阪医科大学研究支援センター，[3] 関西大学先端科学技術推進機構，[4] 国立循環器病研究センター研究所　生体医工学部
○西岡　悟 [1]，伊井　正明 [2]，平野　義明 [1,3]，山岡　哲二 [4]，柿木　佐知朗 [1,3,4]

【緒言】　延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)は、柔軟性に優れた撥水性の高分子材料であり、安定なアルブミン吸着層の形成にもとづく優れた抗血小板粘着性を示す。それゆえ、ePTFE 製人工血管は小口径を中心に広く利用されているが、血小板だけでなく血管内皮細胞も接着しないため、長期間埋入時には不完全な内膜再生によって閉塞する。ePTFE 製人工血管内腔面への細胞接着性ペプチドの固定化による表面改質はこれまで多く研究されてきたが、未だに臨床応用されるには至っていない。我々はアミノ酸のチロシンを酸化で生じるキノンを利用した ePTFE 基材表面へのペプチドの直接固定化に成功している [1,2]。しかし、ePTFE へのペプチドの固定化量が少ないためか、細胞の接着が僅かしか亢進されなかった。そこで本研究では、ePTFE 表面のゼータ電位が負であることとキノンがアミノ基とマイケル付加反応する点に注目して、各 3 残基のチロシンとリジンでなる $(YK)_3$ アンカーを新たに設計し、その酸化を介した ePTFE 基材上へのインテグリン $\alpha_4\beta_1$ リガンド(Leu-Asp-Val)の安定かつ高効率な固定化を試みた。

【実験】　Ac-YG_3LDV(AcY)および Ac-$(YK)_3G_3$LDV(Ac$(YK)_3$)の水溶液 (1.0 mM)に ePTFE 基材を浸漬し、$CuCl_2$ (0.04 eq.)と H_2O_2 (4.4 eq.)を添加して 50℃で 24 時間反応させた。反応後の ePTFE 表面の水濡れ性を水接触角計で、表面の元素組成および固定化ペプチドの安定性を X 線光電子分光(XPS)でそれぞれ解析した。さらに、ペプチドを固定化した ePTFE 上にヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)を播種・培養し、初期および長期における接着挙動を評価した。

【結果と考察】　Ac$(YK)_3$ で反応後、ePTFE 表面の水接触角は約 35°減少し、AcY 反応後と比較しても 20°も小さくなった。反応後の XPS での解析では、ペプチド由来の窒素のピークが検出され、基材由来のフッ素のピーク強度が減少した。この傾向は Ac$(YK)_3$ でより顕著であり、アンカー部のチロシン残基の増加とリジン残基の導入による ePTFE へのリガンド固定化効率の向上が示唆された。また、固定化した Ac$(YK)_3$ は SDS もしくは NaCl 水溶液による洗浄後も維持され、AcY と比較して安定な固定層を形成していることが示唆された(Fig. 1)。さらに、AcY よりも Ac$(YK)_3$ 固定化表面により多くの HUVEC が接着し、8 日間の培養では細胞の増殖も認められたことから、$(YK)_3$ アンカーによるリガンド固定化効率の向上が HUVEC の安定な接着と増殖を誘引することが示唆された。

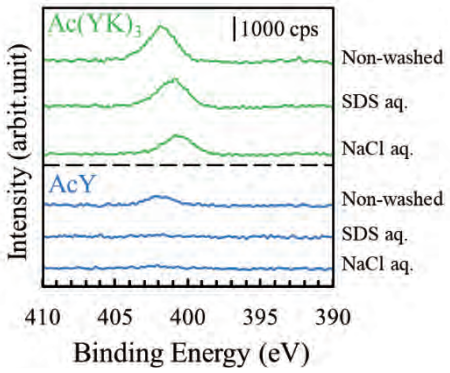


Fig.1　XPS analysis (N 1s) of ePTFE surfaces immobilized with AcY or Ac$(YK)_3$ after washing with SDS or NaCl aqueous solution.

参考文献
1) S. Kakinoki and T. Yamaoka, *Bioconj.Chem*., 26(2015)639-644.
2) S. Kakinoki, K. Takasaki, T. Yamaoka et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*,106A(2018)491-499.

Stable and direct immobilization of cell adhesion ligand on ePTFE substrate using peptide anchor

Satoru Nishioka[1], Masaaki Ii[2], Yoshiaki Hirano[1,3], Tetsuji Yamaoka[4], Sachiro Kakinoki[1,3,4,*]
[1]Department of Chemistry and Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, [2]Research and Development Center, Osaka Medical College, [3]ORDIST, Kansai University, [4]Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
*Tel and FAX: 06-6368-3033, *E-mail: sachiro@kansai-u.ac.jp

2P-002

異なる基底膜構造を有する脱細胞化血管における細胞挙動

[1] 東京医科歯科大学　生体材料工学研究所、[2] 大阪工業大学　生命工学科
○小林真子[1]，近藤真由香[1]，橋本良秀[1]，藤里俊哉[2]，木村剛[1]，岸田晶夫[1]

【緒言】近年、生体組織から細胞成分を除去した脱細胞化生体組織が開発され、高い生体適合性および機能性を持つことが注目されている。我々は高静水圧（HHP 法）によって脱細胞化血管を作製し、in vivo で優れた開存性を示すことを見出してきた[1)]。この理由として HHP 法による脱細胞化血管では、血管内腔の基底膜構造や機能が維持され、内皮細胞などのレシピエント細胞がリクルートされた結果、高い抗血栓作用を有するのではないかと推察している。内皮細胞のリクルートが、高い抗血栓性に必要であることは、脱細胞化血管内腔に REDV ペプチドを固定化した小口径人工血管の研究でも報告されている[2)]。これまでに細胞の接着や形態に血管基底膜の形状および構造が影響することも示してきた[3)]。本研究では、HHP 法や SDS 法により得られた脱細胞化血管の内腔表面上に血管内皮細胞（HUVEC）を播種し、その接着性や機能発現を解析することで、これまでに報告した血管内腔の基底膜構造の細胞挙動への影響に加え、基底膜の生理機能の解明を目指す。

【実験】 ブタの大動脈（内径 1cm, 長さ 4cm 程度）を 1000MPa、30℃の条件で高圧印加し、洗浄過程を経ることで HHP 脱細胞化血管を作製した。また、界面活性剤（SDS）を用いた脱細胞化として、異なる 3 種類の SDS 法（Method 1, 2, 3）にて SDS 脱細胞化血管を作製した。得られた脱細胞化血管を H-E 染色、SEM 観察および DNA 定量にて評価した。さらに、作製した脱細胞化血管上にヒト血管内皮細胞（HUVEC）を播種し、細胞の接着性、増殖性を検討し、内皮細胞機能を RT-PCR による mRNA 発現量解析にて試みた。

【結果と考察】
SDS 処理による脱細胞化では、繊維間に隙間の拡大が示され、基底膜構造が維持されず、細胞核の完全な除去が示されなかった（Fig1(B), (C), (D)）。一方で、HHP 法では、基底膜構造が維持され、細胞の残渣がほとんど認められなかった（Fig1(E)）。以上の結果より、HHP 処理は、SDS 処理と比較して、血管内腔の基底膜構造を維持したまま脱細胞化できることが示唆された。発表では、作製した異なる基底膜構造を有する脱細胞化血管を用いて、その基底膜表面上での HUVEC の細胞接着の様子や内皮細胞の機能発現に関連する遺伝子の発現量解析を行うことで基底膜の生理機能について発表する予定である。

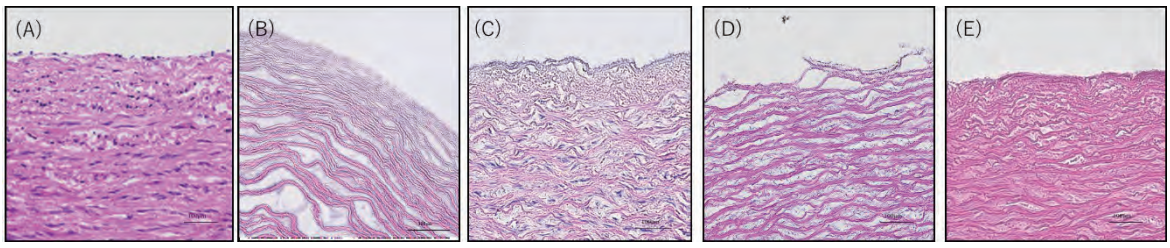


Figure 1. Photographs of H-E staining of porcine aorta. (A)Untreated aorta, (B) Method 1 SDS decellularized aorta, (C) Method 2 SDS decellularized aorta, (D) Method 3 SDS decellularized aorta, (E)HHP decellularized aorta

【参考文献】1) S.Funamoto, et al., Biomaterials 31, 3590-3595 (2010), 2) A.Mahara, et al., Biomaterials 58, 54-62 (2015), 3)木村剛 他、第 47 回医用高分子シンポジウム講演要旨集, 129-130, 2018

Cell behavior on the decellularized aorta with various basement membrane structures

Mako Kobayashi[1], Mayuka Kondo[1], Yoshihide Hashimoto[1], Toshiya Fujisato[2], Tsuyoshi Kimura[1], Akio Kishida[1]
[1]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [2] Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology,
Tel: +81-03-5280-8028, E-mail :kishida.mbme@tmd.ac.jp

2P-003

機能性ペプチドを用いた 3 次元積層造形 CCM 合金の表面処理と細胞接着性の改善

[1] 山形大学大学院理工学研究科，[2] 物質・材料研究機構，[3]NTT データエンジニアリングシステムズ
○右田　聖[1]，齊藤　雄太[1]，山崎　智彦[2]，蘇亜拉図[3]

【緒言】　コバルトクロムモリブデン(CCM)合金はその力学的・化学的性質から、人工関節の摺動部や義歯床、ステントの体躯として用いられている。近年の付加製造(AM)技術とりわけ 3 次元造形技術の発達により、CCM 合金製のデバイスも AM 法によって作成することが可能になった。しかしながら、その製造工程において生体機能性を付与することはできない。このためステントのように埋植後早期に内皮化されることが望ましいデバイスにおいては、適切な表面処理が必要となる。我々はこれまでに、CCM 合金に特異的に結合する機能性ペプチドを探索し、その配列を明らかにしてきた。本研究では、これらのペプチド配列のなかで、3 次元積層造形した CCM 合金(3D-CCM)に対して特異的な結合性を示す配列について検討を行った。また、この CCM 結合ペプチドに細胞接着性モチーフである GRGDS を連結し、血管内皮細胞の接着性向上について検討した結果も併せて報告する。

【実験】　CCM 粉末には EOS　MP1(Co-28Cr-6Mo)を用いた。3 次元積層造形には EOSINT M システムを用いた。まず直径 8 ミリの円柱状の CCM 合金を造形した。この円柱を 2 ミリ厚の円板状に切断し、試料とした。CCM 結合配列を持つペプチド(CCM 結合ペプチド)はファージディスプレイ法により選択した。選択した CCM 結合ペプチドのアミノ酸配列を調べ、3D-CCM への結合能を評価した。ストレプトアビジンによりラベルした CCM 結合ペプチドの水溶液に 3D-CCM を浸漬し、37℃で 1 時間インキュベートすることで 3D-CCM 表面をペプチド修飾した。ペプチドの結合能は、ビオチン化した HRP との相互作用を利用して検討した。さらに CCM 結合ペプチドに RGD 配列を連結したペプチド (CCM-RGD) を合成し、3D-CCM 表面を修飾した。この表面におけるウシ血管内皮細胞(CPAE)の接着性を評価した。

【結果と考察】　4 種類の CCM 結合ペプチドを 3D-CCM に適用した。その結果、明らかに高い結合能を示す配列を 1 つ見出した。このペプチドに RGD 配列を連結した CCM-RGD ペプチドを合成し、3D-CCM を修飾した。ここに CPAE を播種したところ、培養 4 時間で 3D-CCM 表面は組織培養用ポリスチレンの表面よりも高い細胞接着性を示した。この傾向は、培養 24 時間後においても同様であった。また、培養液中の血清の有無はこの結果に影響を及ぼさないことも明らかにした。以上から、3D-CCM に特異的に結合する機能性ペプチド配列を見出し、このペプチドを用いた表面修飾が血管内皮細胞の接着性向上に有効である可能性を見出した。

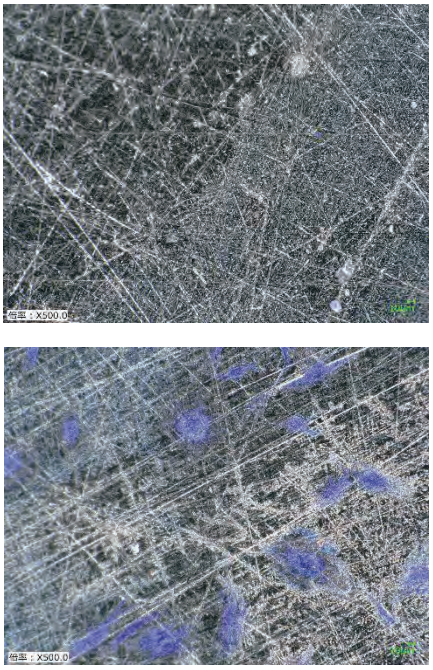


図 1　未処理の 3D-CCM(上)および CCM-RGD 修飾した 3D-CCM(下)における CPAE 細胞

Surface modification of 3D-printed CCM to improve endothelial cell adhesion using functional peptide

Satoshi Migita[1], Yuta Saito[1], Tomohiko Yamazaki[2], Suyalatu[3]
[1]Guraduate School of Science and Engineering, Yamagata University
[2]National Institute for Materials Science (NIMS)
[3]NTT DATA ENGINEERING SYSTEMS
Tel: +81-238-26-3740, E-mail: migita@yz.yamagata-u.ac.jp

2P-004

物理架橋ポリビニルアルコールを用いた自己拡張型ハイドロゲルステントの設計

[1] 東京都立産業技術研究センターバイオ応用技術グループ，[2] 東京医科大学消化器内科学分野，
[3] 福井大学大学院工学研究科，[4] 福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構
○永川　栄泰[1,3]，柚木　俊二[1]，糸井　隆夫[2]，土屋　貴愛[2]，末　信一朗[3,4]，藤田　聡[3,4]

【緒言】胆管ドレナージに用いられる自己拡張型金属ステントは、長期開存性という長所があるものの再狭窄が生じた際に抜去できず、プラスチックステントは抜去可能であるが早期に閉塞してしまうという課題を抱えている。我々は両者のステントの長所を両立した新規なステントとして、ポリビニルアルコール（PVA）ハイドロゲルの膨潤性を自己拡張性の駆動力へと転換した胆管ステントを着想した。本研究では、円筒状に成型した PVA ハイドロゲルの設計と拡張性評価の結果について報告する。

【実験】重合度 1,700、ケン化度 98.0–99.0 %の PVA（クラレ社製ポバール：PVA-117）を用いた。10 wt%に調製した PVA 水溶液に 2 M の硫酸ナトリウム溶液を滴下し塩析沈殿物を得、凍結融解処理により物理架橋 PVA ゲルを作製した。PVA ゲルの機械的強度は貯蔵弾性率及び引裂強度により評価し、体積膨潤度は 37℃の生理食塩水に浸漬し膨潤時の体積（V_s）を乾燥時の体積（V_d）で除すことにより評価した。円筒状に成型した PVA ゲルを延伸倍率 1.0–2.5 倍で乾燥させた。乾燥後の円筒型 PVA ゲルを 37℃の生理食塩水に浸漬し、膨潤後の全長、内径及び外径を計測した。

【結果と考察】乾燥状態での円筒状 PVA はプラスチックステントに類似した屈曲性を有し、膨潤後はゴム様の弾性体へと変化した。体積膨潤度は 3.1 ± 0.1 であり，膨潤後には、全長、内径及び外径のいずれも増加した。乾燥時に延伸しなかった場合は、全長、内径及び外径はそれぞれ約 1.5 倍と相似拡大した（Fig. 1(a)）。これに対し、延伸下で乾燥すると、延伸倍率が大きくなるにつれて全長の増加倍率が低下し、一方で、内径および外径の増加倍率が高くなった。2 倍延伸下で乾燥して作製した円筒型 PVA の膨潤前後の外観を Fig. 1(b)に示す。膨潤前後で全長がほぼ変化せず、内径・外径が約 2 倍に増加する円筒型 PVA ゲルが得られ、高い自己拡張性を示した。また、引張試験においても十分な引裂強度を有することも示された。以上の結果から、内径の自己拡張性を有し、クランプによる抜去が可能な“ハイドロゲルステント”の基本コンセプトが示された。

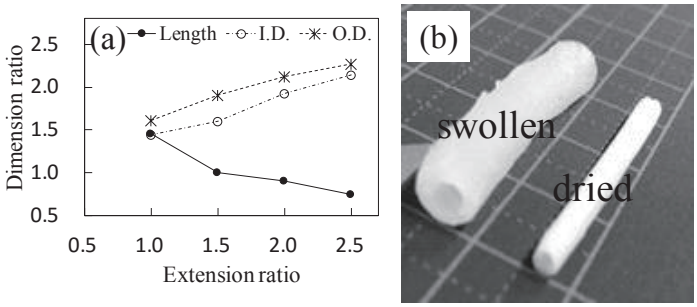


Figure 1. (a) Increase in dimension of dried cylindrical PVA hydrogel. Length, inner (I.D.) and outer diameters (O.D.) were plotted to extension ratio in drying of cylindrical PVA. (b) Appearances before and after swelling.

【謝辞】株式会社クラレより PVA（ポバール）をご提供頂いた。PVA ゲルの構造分析について都産技研の小川大輔研究員の助言を受けた。ここに感謝の意を表する。

Design for self-expandable hydrogel stents by using physically cross-linked poly(vinyl) alcohol

Yoshiyasu Nagakawa[1,3], Shunji Yunoki[1], Takao Itoi[2], Takayoshi Tsuchiya[2], Shin-ichiro Suye[3,4], Satoshi Fujita[3,4]
[1]Biotechnology Group, Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, [2]Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical University, [3]Graduate School of Engineering, University of Fukui, [4]Life Science Innovation Center, University of Fukui
Tel: +81-3-5530-2671, Fax: +81-3-5530-2629, E-mail: nagakawa.yoshiyasu@iri-tokyo.jp

2P-005

超音波噴霧熱分解法による銀担持炭酸カルシウムの調製とその粉体性状

[1]明治大学大学院　理工学研究科，[2]明治大学　研究・知財戦略機構，[3]ORTHOREBIRTH 株式会社，[4]名古屋工業大学大学院　生命・応用化学専攻
○上田　真結[1]，横田　倫啓[2]，本田　みちよ[1]，大坂　直也[3]，牧田　昌士[3]，西川　靖俊[3]，春日敏宏[4]，相澤　守[1]

【緒言】インプラントを用いた手術では、埋入インプラント表面で細菌がバイオフィルムを形成することにより発症する手術部位感染が問題となっており、耐感染性を備えた生体材料の開発が必要とされている。本研究では、抗菌性無機フィラーの開発を目指し、人工骨補填材などの生体材料の成分として利用されている「炭酸カルシウム」と抗菌剤の「銀」を組み合わせた「銀担持炭酸カルシウム粉体」の調製に着手した。炭酸カルシウムは溶解性が高く、溶出した Ca^{2+}イオンには骨形成を促す働きがある。この複合材料の合成方法として、組成を制御したマイクロサイズの球状粉体を合成することができる「超音波噴霧熱分解法」を利用した。今回は、超音波噴霧熱分解法により銀担持炭酸カルシウム粉体を調製し、その粉体性状を調べたので報告する。

【実験】酢酸カルシウム一水和物水溶液に、銀添加量が 0，1，5，10 mol%となるよう硝酸銀を添加し、これを試料溶液とした。この溶液を 600 ℃ で超音波噴霧熱分解することにより粉体を調製し、洗浄処理および凍結乾燥を経て、銀担持炭酸カルシウム粉体「Ag-$CaCO_3$(x)」を得た。なお、カッコ内の x は仕込みの銀添加量(mol%)を示している。Ag-$CaCO_3$ 粉体の評価には、粉末 X 線回折(XRD)、透過型電子顕微鏡(TEM)、エネルギー分散型 X 線分光法(EDX)などを用いた。また、Ag-$CaCO_3$ 粉体からの Ca^{2+}および Ag^{+}イオンの溶出挙動を調査した。浸漬液には 20 mmol·dm^{-3} HEPES 緩衝液(pH = 7.30)を用い、溶出液中の Ca^{2+}イオンおよび Ag^{+}イオンの定量には誘導結合プラズマ発光分光法(ICP-AES)を用いた。次に、黄色ブドウ球菌(グラム陽性菌)に対する Ag-$CaCO_3$ 粉体の抗菌性評価試験を行なった。試験には Ag-$CaCO_3$ 粉体を LB 培地に浸漬させて得られた溶出液を用い、濁度測定により菌数の測定をした。

【結果と考察】XRD による結晶相の同定より、銀を添加した Ag-$CaCO_3$(1)、Ag-$CaCO_3$(5)、Ag-$CaCO_3$(10)粉体はカルサイト型炭酸カルシウムと銀の混合相であることがわかった。また、TEM-EDX による超微細構造の観察および元素分析から、調製した Ag-$CaCO_3$ 粉体は、マイクロメーターサイズの炭酸カルシウム粒子中に、銀がナノメーターサイズの粒子として存在していることが確認された。Ag-$CaCO_3$ 粉体のイオン溶出試験では、28 日間にわたって粉体から Ca^{2+}イオンおよび Ag^{+}イオンが持続的に溶出した。このことから、調製した Ag-$CaCO_3$ 粉体は溶出した Ca^{2+}イオンによる骨形成の促進および溶出した Ag^{+}イオンによる抗菌性の発現が期待できる。Ag-$CaCO_3$ 粉体の溶出液を用いた抗菌性試験では(図 1)、銀を含有しているサンプルが黄色ブドウ球菌の発育を大きく抑制していることが確認され、粉体から溶出した銀イオンによる抗菌性の発現が示された。以上の結果より、調製した銀担持炭酸カルシウム粉体は骨形成を促し、抗菌性も発現するような無機フィラーとして、耐感染性を備えた生体材料への展開が期待できる。

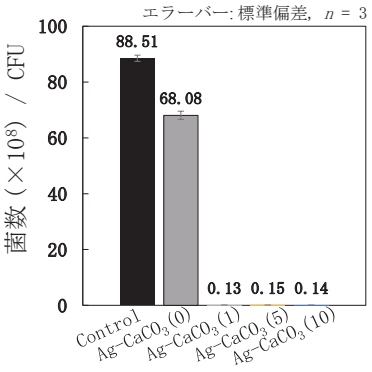


図 1　黄色ブドウ球菌に対する抗菌性試験結果

Preparation of silver-containing calcium carbonate via ultrasonic spray-pyrolysis route and their powder properties

Mayu Ueda [1], Tomohiro Yokota [2], Michiyo Honda [1], Naoya Osaka [3], Masashi Makita [3], Yasutoshi Nishikawa [3], Toshihiro Kasuga [4], Mamoru Aizawa [1]
[1]School of Science and Technology, Meiji University [2]Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University [3]ORTHOREBIRTH Co. Ltd. [4]Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology
Tel: +81-44-934-7237, E-mail: mamorua@meiji.ac.jp

2P-006

アパタイト核処理による導電性 CNT／PEEK 複合材料へのアパタイト形成能付与

[1] 京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻
[2] 京都大学エネルギー理工学研究所
○石崎千尋[1]，薮塚武史[1]，昼田智子[1]，福島啓斗[1]，高井茂臣[1]，八尾健[2]

【緒言】
アパタイトは細胞やタンパク質などの生体と親和性が極めて高いことが知られている。アパタイトと他の機能性材料とを微細なスケールで組み合わせることにより、バイオセンサーやチップデバイスなど、細胞をセンサー素子として利用する高機能な小型デバイスの開発が可能であると考えられる。
ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を持つ水溶液である擬似体液（SBF）の温度および pH を調整すると、均一核形成によりリン酸カルシウムの微粒子（アパタイト核）が析出する[1]。我々はこれまでの研究で PEEK に硫酸処理、酸素プラズマ処理を行った後に PEEK 表面にアパタイト核を形成させることで、SBF 中でアパタイト核がヒドロキシアパタイトの形成を高活性に誘起し、1 日以内に表面全体がヒドロキシアパタイトで被覆させることを見出した[2,3]。本研究では、PEEK 母材にカーボンナノチューブを配合し、良好な導電性を付与したカーボンナノチューブ／PEEK 複合材料(CNT-PEEK)に同様の処理を行うことで CNT-PEEK へのアパタイト形成能付与を試みた。

【実験】
10%のカーボンナノチューブを配合した棒状の CNT-PEEK（直径 1 cm）を 2 mm 幅に切り出し、両面を研磨したものを基板として用いた。その後 98 wt%硫酸を用い、室温で CNT-PEEK の硫酸処理を行った。この基板へ酸素プラズマを 200 W で 4 分間照射し表面の親水性を向上させた。プラズマ照射後の基板を速やかに 25.0℃、pH 8.40 に調整した SBF に浸漬し、70℃で 24 時間保持した。上述の操作によりアパタイト核を析出させた基板を生理的条件（36.5 ℃、pH 7.40）に調整した SBF 中に 7 日間浸漬し、アパタイト形成能を評価した。
上記の各過程における基板表面について、電界放出型走査型電子顕微鏡（FE-SEM）、エネルギー分散型 X 線分析装置（EDX）、薄膜 X 線回折測定装置（TF-XRD）、接触角測定装置を用いて観察および分析を行った。

【結果と考察】
硫酸処理により CNT-PEEK 表面に直径約 500 nm の網目状の細孔が形成された。この基板のプラズマ処理により接触角が 92.4° から 4.7° まで低下したことから基板表面に親水性が付与されたことが確認された。さらに、25.0℃、pH 8.40 に調整した SBF に 70℃で 24 時間浸漬した後の EDX 分析の結果、P と Ca のピークが検出された。このことから基板表面にリン酸カルシウムが析出したと示唆された。また SBF 浸漬 7 日後に表面全体に骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状結晶が SEM により観察された。これにより CNT-PEEK 表面にヒドロキシアパタイトが形成されたことが分かった。
以上の結果より、CNT-PEEK へのアパタイト形成能付与の実現により、CNT-PEEK が有する電気的性質とアパタイトが有する生体適合性の双方を具備する材料の開発が可能であることが分かった。

【参考文献】
[1] T. Yao, M. Hibino, T. Yabutsuka, US Patent /US8512732 (2013), Japan Patent/5252399(2013).
[2] T. Yabutsuka et al., Mater. Sci. Eng. C, 81, 349-358(2017).
[3] T. Yabutsuka et al., J. Biomed. Mater. Res. B, in press.

【謝辞】
本研究の一部は、JSPS 科研費（16K16401）、村田学術振興財団研究助成、京都大学リサーチ・ディベロップメントプログラム「いしずえ」により遂行した。

Apatite-forming ability of apatite nuclei incorporated carbon nanotube-PEEK composite

○Chihiro ISHIZAKI[1], Takeshi YABUTSUKA[1], Tomoko HIRUTA[1], Keito FUKUSHIMA[1]
Shigeomi TAKAI[1], Takeshi YAO[2]
[1]Graduate School of Energy Science, Kyoto University
[2]Institute of Advanced Energy, Kyoto University
Tel: +81-75-753-9129, Fax: +81-75-753-9115, E-mail:yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

2P-007

第 4 級アンモニウム基を有するポリマーのグラフト化による PEEK 表面への殺菌性付与

[1] 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻，[2] 国立研究開発法人理化学研究所
○大愛　景子[1]，井上　祐貴[1]，中尾　愛子[2]，石原　一彦[1]

【緒言】オールプラスチック製医療デバイスは、CT や MRI といった医療機器による診断への干渉を低減する。また、成形加工の際に 3D プリンターとの併用も可能となり、個人に適用できるデバイス形状も容易に実現できる。ここで、スーパーエンジニアリングプラスチックで優れた機械的強度と化学的安定性を持つ poly(ether ether ketone) (PEEK)は、光照射により表面にラジカルを発生するため、フリーラジカル重合によってポリマーグラフト鎖を形成できることを見出した[1]。この自己開始型光グラフト重合により、PEEK 表面に必要な表面特性を付与できる。医療デバイスの設計においては、機械的特性といったバルク特性に加え、生体分子と接触する界面における生体応答を考慮した適切な表面特性が求められる。医療インプラントに関わる生体応答として重篤な問題が、バイオフィルム(BF)が誘発する感染である。BF とは、物質表面に付着した微生物集団とこれが生産する細胞外高分子物質が形成する 3 次元構造体であり、コロニーが崩壊すると大量の細菌が放出される。BF は薬剤や生体免疫の拡散・透過を抑制するために、内部の細菌を死滅させることができない。そこで BF 形成そのものの阻害が求められる。そこで本研究では、表面に殺菌機能を付与した PEEK 材料の創製を目的とした。

【実験】PEEK 基板を 2-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA)水溶液に浸し、波長 350 ± 50 nm の光を 10 分および 30 分照射することで、表面に poly(DMAEMA) (PDMAEMA) 層を構築した。次いで、C_4H_9Br あるいは $C_{12}H_{25}Br$ を用いたメンシュトキン反応により、PDMAEMA 層を、第 4 級アンモニウムカチオン(QA)を有するポリマー層へと改質した。大腸菌を含む菌液を各修飾後基板表面に接触させ、未修飾の PEEK 基板表面に接触させた場合を基準とし、菌液中の大腸菌の生存率を調べた。

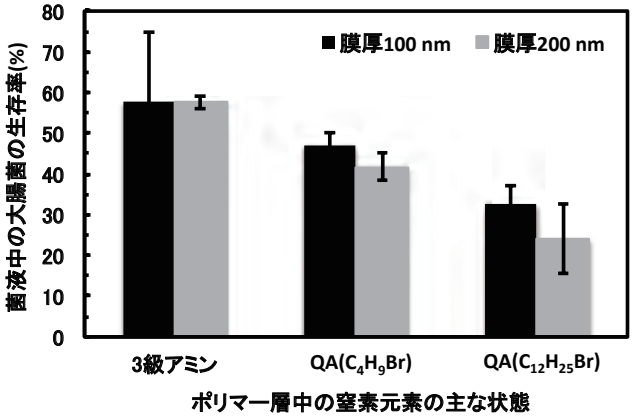


Figure 1 各修飾後基板表面に接触させた菌液中の大腸菌の生存率

【結果と考察】XPS および ATR−FTIR などの表面解析により、PEEK 表面に PDMAEMA 層が構築されたことを確認した。またメンシュトキン反応後は、表面に QA の存在が確認された。Figure 1 に示すように、PDMAEMA 層の膜厚がより長く、QA 末端の炭素鎖がより長い PEEK 表面が最も高い殺菌性を示した。前者は、重合時間が長くなると、グラフト鎖の膜厚、鎖長のばらつき及び密度が増加するため、大腸菌 1 個あたりが接する QA の数が多くなり、カチオンが細胞膜のアニオン性構成成分を引き抜くという殺菌機構が増強されたためだと考えられる。後者は、ポリマーの疎水部分が細胞膜に貫入することで細胞膜の整合性を阻害する殺菌機構が効果的に機能したためだと考えられる。これらの結果より、PEEK の機械的特性と表面殺菌性を有するポリマーバイオマテリアルの創製が可能となった。

[1] M. Kyomoto *et al., ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 537−542 (2009)
本研究は AMED の S−イノベーション革新的医療を実現するためのバイオ機能材料の創製によった。

Antibacterial PEEK with quaternized ammonium via self-initiated surface graft polymerization

Keiko OAI[1], Yuki INOUE[1], Aiko NAKAO[2],Kazuhiko ISHIHARA[1]
[1]Department of Materials Engineering, the University of Tokyo
[2]Institute of Physical and Chemical Research
Tel: +81-3-5841-7128, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: oai@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

2P-008

ハイドロキシアパタイトと L ポリ乳酸より作製した新規骨接合材の in vivo 骨形成能評価

[1]京都大学大学院医学研究科　感覚運動系外科学講座整形外科学，[2]敷波保夫研究所
○森實　一晃[1]，敷波　保夫[2]，藤林　俊介[1]，後藤　公志[1]，大槻　文悟[1]，河井　利之[1]，清水　孝彬[1]，松田　秀一[1]

【緒言】非焼成ハイドロキシアパタイト(HA)と L-ポリ乳酸(PLLA)との鍛造強化材である Super-Fixsorb(SF)は、生体活性吸収性骨接合材として臨床にて広く普及しているが、大きなものは骨との完全置換に 10 年近く要し、長期残存による皮下触知や異物反応などの問題が残る。本研究は鍛造 PLLA の特徴である靭性と HA との composite に基づく剛性を維持し、かつ生体活性能と吸収能がより向上した骨接合材の開発を目的とする。Control の SF では HA 微粒子は非連続的単純分散であるのに対し、連結した新規分散形態である新規群を開発し in vivo での評価を行ったので報告する。

【実験】HA/PLLA の混合繊維と PLLA のみの単独繊維が交差した不織布を作製し、それらを充填、圧縮、脱気しチョーク様ロッドを作製。これを約 200℃に加熱して PLLA を熔融させ、熔着、冷却固化して緻密体とし、次に 105℃で軟化させ鍛造ロッドを作製した。HA/PLLA の全比率は SF と同様に重量比で HA/PLLA=30/70 とした。ただし、混合繊維内の HA 微粒子は連結している霜降り状の高濃度状態にある。これらと SF で作製したロッドを 32 羽の日本白色家兎の大腿骨遠位骨髄内に埋入し、4、8、12、25 週で力学的・画像学的・組織学的に評価した。

【結果】押し抜き試験・曲げ強度試験では 2 群間で有意な差はなく、曲げ試験では 2 群とも 12 週にわたりヒト皮質骨より高い値を示した。μCT で計測した周囲新生骨の割合は、新規群で高い傾向を示した。組織学的には SF 群に比べ新規群で早期よりロッド周囲及びロッド内への新規骨形成が 8 週より認められ、25 週では有意にロッド断面積の縮小を認めた。

【考察】今回開発した HA/PLLA 骨接合材は早期より周囲骨と顕著な親和性を示し、高い骨との一体化と置換能を有することが示唆された。三次元的に絡み合った HA/PLLA 繊維と PLLA 繊維により、早期から連結層を経由した体液侵入があり PLLA の加水分解と HA 微粒子の生体活性が高まったと考えられ、新規の生体吸収性骨接合材として臨床実用が期待できる。

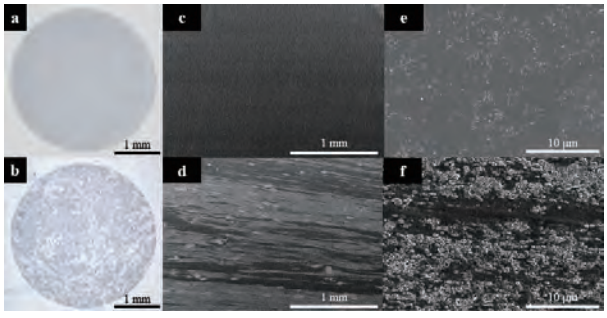


Figure 1. Optical microscope images of (a)SF and (b)new composite, and SEM images of (c,e)SF and (d,f)new composite.

Implantable composite devices of unsintered hydroxyapatite and poly-L-lactide with dispersive marbling morphology to enhance bioactivity and bioresorbability

Kazuaki Morizane[1], Yasuo Shikinami[2], Shunsuke Fujibayashi[1], Koji Goto[1], Bungo Otsuki[1], Toshiyuki Kawai[1], Takayoshi Shimizu[1], Shuichi Matsuda[1]
[1]Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University
[2]Shikinami Yasuo Institute
Tel: +81-75-751-3366, Fax: +81-75-751-8409, E-mail: morizane@kuhp.kyoto-u.ac.jp

2P-009

動的細胞培養を可能とするHAp複合培養基材の創出と材料評価

[1]近畿大学大学院生物理工学研究科，[2]大阪歯科大学中央歯学研究所，[3]大阪歯科大学口腔外科学第一講座，[4]株式会社ソフセラ，
○南浦　亮介[1]，本田　義知[2]，上田　衛[3]，小粥　康充[4]，上向井　徹[4]，古薗　勉[1]

【緒言】骨組織の応力に対する受容体機序を解明する試みはなされているが、その解明は十分ではない。その理由として、一般的な動的細胞培養基材に細胞は伸展するが、骨組織を模倣した基材の開発が途上な点が考えられる。そこで本研究では、骨組織の硬組織成分となるハイドロキシアパタイト(HAp)をナノ粒子化させて透明で伸縮性のある基材にコーティングすることで、動的細胞培養に適した基材を創出した。創出した基材に対して引っ張り試験を実施することで、基材の伸縮がHApナノ粒子の表面被覆率に与える影響を評価した。また当該基材上にラット骨芽細胞様細胞株(UMR106)およびヒト脂肪由来幹細胞(hADSC)を播種した細胞培養試験を実施した。

【実験】HApナノ粒子およびZn-HApナノ粒子は湿式法にて合成した。また得られた粒子の分散性向上のため、融着防止処理を施してから仮焼することで、分散性および結晶性に優れるHApおよびZn-HApナノ粒子を得た。キャラクタリゼーションとして、XRDおよびFT-IRを用いた。またZn-HApナノ粒子のZn置換率はICP-OESを用いた。HAp複合培養基材は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)シートにアクリル酸をグラフト重合することで表面に導入したカルボキシル基と、各ナノ粒子の静電的相互作用により結合させることで調製した。調製した培養基材に対する力学的評価としてサーボパルサを用いた引っ張り試験を行った。試験は1日および3日間行い、試験後の基材をSEM観察することで試験前後のHAp表面被覆率を評価した。次に生物学的評価として細胞培養試験を実施した。骨芽細胞はHAp複合基材上に播種して動的細胞培養を行い、ヒト脂肪由来幹細胞はZn-HAp複合基材上に播種して静的細胞培養を行った。基材上に接着した細胞の形態観察は光学顕微鏡を用いて行った。

【結果と考察】XRD測定より、得られたHApおよびZn-HApナノ粒子はHApの結晶構造を有していることが確認され、FT-IR測定より、各ナノ粒子はHApに由来する官能基の吸収が認められた。またICP-OES測定より、Zn-HApは仕込み比の8割のZnイオンの置換が確認された。引っ張り試験の実施前後の培養基材の表面をSEM観察した結果、HApナノ粒子の表面被覆率は、試験前後で大きな差が生じていないことが確認された。HApを複合した培養基材上に骨芽細胞を播種して動的細胞培養を行った結果、ひずみ方向に対して垂直方向への配向が確認された。この結果より、当該培養基材が動的細胞培養に好適であると同時に、本試験条件は骨芽細胞がメカニカルストレスを感知する強さであることが分かった。またZn-HApを複合した培養基材上にヒト脂肪由来幹細胞を播種した結果、Zn置換率上昇に伴って接着性の向上が確認された。これはZn置換に伴うHApの表面性状の変化や、Znイオン取り込みの影響が考えられた。以上の結果より、HAp複合培養基材は動的細胞培養を用いた生物学的評価に有用であることが示唆された。

Development and evaluation of HAp-composite substrates for cell culture

Ryosuke Minamiura[1], Yoshitomo Honda[2], Mamoru Ueda [3], Yasumiti Kogai[4], Toru Uemukai[4], Tsutomu Furuzono[1]
[1]Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University [2]Institute of Dental Research, Osaka Dental University [3]First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University, [4]Sofsera Corporation
Tel: +81-0736-77-3888, Ext: 5206, E-mail: furuzono@waka.kindai.ac.jp

2P-010

血管と骨形成を促進するハイドロゲル構造体の作製

[1] 九州大学先導物質化学研究所ソフトマテリアル学際化学分野，[2] 東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野，[3] スタンフォード大学整形外科
○穴田　貴久[1,2,3]，鈴木　治[2]，Yunzhi Yang[3]

【緒言】
骨欠損の修復において自家骨移植の代替となるバイオマテリアルの開発が求められている。自己再生の難しい大きな骨欠損の場合には、欠損部周辺の血管形成が不十分だと骨修復が遅れたり十分な骨再生が起こらないことが問題である。可視光によるデジタルライトプロセシング（DLP）は、細胞やタンパク質へのダメージが少なく、生体材料への応用が可能な三次元光造形技術である。本研究は、光架橋性ゼラチン（GelMA）に血管形成を促進するためのスフェロイド化血管内皮細胞及び骨形成を促進するためのリン酸オクタカルシウム（OCP）を混合し DLP によって血管と骨形成を促進することができるハイドロゲル構造体の作製を行った。今回はこのハイドロゲルによる間葉系幹細胞の骨芽細胞分化と血管内皮細胞の血管形成に与える影響について検討した。

【実験】
無水メタクリル酸とゼラチンから光架橋性ゼラチン（GelMA）を合成した。OCP は既報[1)]に従って合成し、粒径 53 μm 以下に整粒した。スフェロイド培養デバイスはポリジメチルシロキサン（PDMS）を用い作製したが、既に報告しているもの[2)]を本研究用に改変して作製した。独自開発の可視光ステレオリソグラフィ（SLA）装置を用いて三次元 GelMA ハイドロゲル構造体を作製した。ハイドロゲル中に種々の容量で OCP 顆粒を混合し、その上で間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 を播種して骨分化培地で培養し、細胞数と骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ（ALP）活性について測定した。また、スフェロイド培養デバイスを用いて調製した血管内皮細胞（HUVEC）スフェロイドをハイドロゲルに内包し、血管様構造体の形成について観察した。

【結果と考察】
外周にはリン酸カルシウムを含むハイドロゲルを、内周には HUVEC スフェロイドを内包するためのハイドロゲル構造を有する二重円型ハイドロゲルを可視光 DLP によって作製することができた。OCP を含むハイドロゲル上で培養した C3H10T1/2 は OCP を含まないゲルと比較して ALP 活性が上昇しており、OCP 含有ハイドロゲルによって骨芽細胞への分化が促進されることが示唆された。スフェロイド培養デバイスは一度に大量の HUVEC スフェロイドを簡便に作製することができた。培養デバイスから回収したスフェロイドをハイドロゲル中で培養することによりゲル中で管腔形成が観察された。この血管様構造体の長さや数はゲルの硬さに依存した。以上の結果から、スフェロイドを内包した OCP 含有ハイドロゲル構造体は骨欠損部位において血管形成と骨形成を促進する可能性が示唆された。

（参考文献）
1. O. Suzuki, M. Nakamura, Y. Miyasaka, M. Kagayama, M. Sakurai, Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite, Tohoku J. Exp. Med. 164 (1991) 37-50.
2. T. Anada, J. Fukuda, Y. Sai, O. Suzuki, An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids, Biomaterials 33 (2012) 8430-8441.

Fabrication of 3D hydrogel constructs to promote vascularization and bone formation

Takahisa Anada[1,2,3], Osamu Suzuki[2], Yunzhi Yang[3]
[1]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, [2]Tohoku University Graduate School of Dentistry, [3]Department of Orthopedic Surgery, Stanford University School of medicine
Tel, Fax: +81-92-802-6238, , E-mail: takahisa_anada@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

2P-011

ナノ構造析出純チタン金属表面へのアメロジェニンコーティングが歯髄細胞に与える効果

[1] 大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座，[2] 大阪歯科大学医療保健学部
○高尾誠二[1]，小正　聡[1]，西崎真理子[1]，寺田知里[1]，波床真依[1]，楠本哲次[1]，吉峰茂樹[1]，西崎宏[2]，小正　裕[2]，岡崎定司[1]

【緒言】　我々は純チタン金属表面にアルカリ処理を行うことで，チタニアナノシート構造（以下，TNS）を析出させ、骨髄細胞の初期接着に有用であることを明らかにした。また，歯周組織の再生方法の一つであるエムドゲインの主要タンパク質であるアメロジェニンをスピンコート法により TNS にコーティングすることで、ラット骨髄細胞および歯根膜細胞の初期接着ならびに硬組織分化誘導能に大きな影響を与えると共に、in vivo レベルにおいてもインプラント埋入周囲組織に新生骨が形成されることが明らかとなった。一般的に歯髄細胞は様々な再生医療に利用できることが明らかで，紫外線など外来刺激を受けないので、再生医療のために保存する細胞として理想的であるといえる。アメロジェニンが歯髄細胞を硬組織に分化誘導することができれば、硬組織ならびに軟組織を同時再生することのできる新たなインプラント材料の開発が可能となる。本実験はナノ構造を析出した純チタン金属表面へコーティングされたアメロジェニンが歯髄細胞の硬組織分化誘導能にどのような影響を与えるのか、これまでの研究業績も併せて報告する。

【実験】実験材料として市販の JIS2 級純チタン金属板を使用し、表面に濃アルカリ処理によりナノ構造を析出させアメロジェニンをスピンコート法によりコーティングしたものを実験群、TNS のみ析出させたものを対照群として使用した。試料の表面構造は SPM にて観察した。試料表面における元素分析を XPS にて行った。各試料表面における元素の結合状態を FTIR にて解析した。次に、生後 7 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から骨髄間葉細胞を採取し、ラット歯根膜細胞は Lonza より購入し、SCGM（BulletKit: Stromal cell growth medium, lonza）を用いて継代培養を行い、歯髄細胞は歯髄細胞バンクより享受し、3 代目を実験に供した。各々の細胞を実験群および対照群の材料群に播種し、培養開始 1，3，6，24 時間の各群における細胞接着数の比較、培養後 14，21 日後の ALP 活性および 21 日後のオステオカルシンの産生量およびカルシウムの析出量を測定した。統計学的解析には，各測定値に Student の t 検定を行った。有意水準は 5%とした。

【結果と考察】SEM および SPM による観察結果では、実験群ではアメロゲニンと推察される構造が示された。XPS および FTIR では、実験群で TNS 構造にタンパク質のコーティングを認めアメロジェニンがコーティングされていることが明らかとなった。各種細胞を使用した in vitro 評価では全ての計測時間において実験群で細胞接着，ALP 活性，オステオカルシン産生量，カルシウム析出量が有意に高い値を示した。

以上の結果により，濃アルカリ処理を施した純チタン金属表面へのアメロジェニンのコーティングが in vitro レベルで歯髄細胞の硬組織分化誘導能の向上に強い影響を与えると共に、インプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導に大きな影響を与えることを明らかにした．また，骨髄細胞、歯根膜細胞に与える影響と併せてもこの新規材料は硬組織および軟組織を同時再生できる材料として期待できる．

Effect of amelogenin coating nano-modified titanium on dental pulp cells

Seiji Takao[1], Satoshi Komasa[1], Mariko Nishizaki[1], Chisato Terada [2], Mai Hatoko[1], Tetsuji Kusumoto[2], Shigeki Yoshimine[1], Hiroshi Nishizaki[2], Yutaka Komasa[2], Joji Okazaki[1]
[1]Department of Removable Prosthodontics and Occlusion, Osaka Dental University
[2] Faculty of Health Sciences Oral Health Engineering, Osaka Dental University
Tel: +81-6-6910-1043, Fax: +81-6-6910-4519, E-mail: takao-s@cc.osaka-dent.ac.jp

2P-012

α型リン酸三カルシウム球の硬化による低結晶性ハイドロキシアパタイト多孔体の作製

[1]九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座生体材料学分野
○岸田　良[1]，Tya Indah Arifta[1]，石川　邦夫[1]

【緒言】骨補填材の生体吸収性を向上させるためには細胞連通性の付与が有効であり、そのために材料への多孔質構造の導入が有望視されている。カルシウム欠損型ハイドロキシアパタイト(cdHAp；$CaHPO_4(PO_4)_5OH$)は骨に近似した組成・結晶化度（低結晶性）を有するが、高温で不安定のため焼結することができず、気孔形成材を用いた多孔体化が不可能である。cdHAp を得る方法としては、α型リン酸三カルシウム（α-TCP)を水和させる硬化反応が知られている。これまでに、我々はα-TCP フォーム顆粒の溶解析出を利用して cdHAp 多孔体を作製することに成功してきたが、機械的強度に問題点があった。顆粒連結多孔体の強度を改善するためには、顆粒の緻密化および顆粒間面接触の導入が有効である。そこで我々は緻密なα-TCP 微小球を調製し、それらを密に充填させた前駆体形状を準備することで、溶解析出により変換された cdHAp 球を連結させた高強度の多孔体を作製する方法を検討した。

【実験】Water-in-oil (W/O)エマルジョン法により調製したα-TCP 球（粒径 300-600 μm）を型に充填し、少量の水を加えて加圧（0, 10, 20, 30 MPa)することで前駆体形状を準備した。硬化反応を完了させるために、100℃の水蒸気と 12 時間接触させる方法と 100 ℃の蒸留水に 12 時間浸漬させる方法を検討した。硬化反応の完了を粉末 X 線回折法（XRD)により確認し、得られた硬化体の構造を走査型電子顕微鏡（SEM)および X 線マイクロ CT（μ-CT)で調べた。また、硬化体の機械的強度として間接引張強さ（DTS)を測定した。さらに骨吸収性および新生骨形成を調べるために、兎大腿骨に骨欠損を形成し、得られた多孔体を埋入し 1, 3 ヶ月経過後、病理組織学的検索（ヘマトキシリン・エオジン染色を行う）による解析を行った。

【結果と考察】全ての系において、12 時間の反応時間でα-TCP 由来の XRD 回折ピークが完全に消失し、ハイドロキシアパタイト由来のピークの出現が確認された。水蒸気に接触させた硬化体には多孔質構造が認められたのに対し、水に浸漬させた硬化体は緻密化が進行し多孔質構造が失われていた。加圧を行わず（0 MPa)に成形した系では球間に連結が得られず、10 MPa 加圧系は容易に崩壊し DTS が測定不能であった。SEM 像およびμ-CT 像からは 20, 30 MPa 加圧系の多孔質構造および球間の連結が確認され、ともに DTS が 1 MPa を超える強度を示した。この強度は、これまでにα-TCP フォーム顆粒を用いて作製されていた cdHAp 多孔体の強度を大きく上回る値である。30 MPa 加圧系の SEM 像からは球に生じたクラッキングが確認されたため、付与する圧力の限界が示唆された。20 MPa 加圧により成形した多孔体を埋入した組織標本からは、試料埋入から 1 ヶ月の時点ですでに部分的な骨吸収および新生骨形成が見られ（Figure 1)、3 ヶ月の時点では緩慢な反応の進行が見られた。本研究の結果より多孔体形成において、硬化反応のための水和環境およびα-TCP 球の充填形状を精密に制御する必要性が示された。前者の条件は球同士の間に生成する cdHAp の架橋の長さに影響し、後者の条件は球間の距離に影響すると考えられ、これらを最適化することの重要性が理解された。

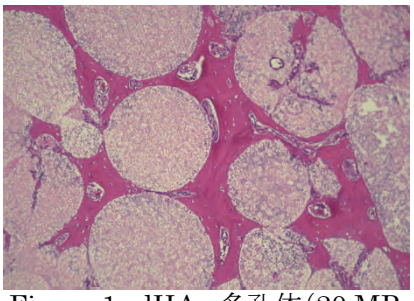


Figure 1 cdHAp 多孔体(20 MPa 加圧により成形）埋入から 1 ヶ月後の組織標本

Porous calcium-deficient hydroxyapatite from the setting reaction of α-tricalcium phosphate spherical granules: evaluation of microstructure, mechanical strength, and new bone formation

Ryo Kishida[1], Tya Indah Arifta[1], Kunio Ishikawa[1]
[1]Department of Biomaterials, Faculty of Dental Science, Kyushu University
Tel: +81-92-642-6436, Fax: +81-92-642-6345, E-mail: kishida@dent.kyushu-u.ac.jp

2P-013

ポリロタキサンの分子可動性調節と成長因子導入による血管ネットワーク形成の促進

[1] 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科，[2] 東京医科歯科大学生体材料工学研究所
○兵頭克弥[1,2]，有坂慶紀[2]，山口　聰[1]，依田哲也[1]，由井伸彦[2]

【緒言】 ポリロタキサン(PRX)は、環状糖分子(e.g. シクロデキストリン)の空洞部に線状高分子(e.g. ポリエチレングリコール)が貫通した超分子構造体であり、環状糖分子が線状高分子鎖に沿って可動する分子可動性が期待される。これまでに当研究室では、この PRX を被膜した細胞培養表面を構築し、低分子量 GTPase である Rho ファミリーの活性化制御に成功している[1]。さらに近年、環状糖分子部位に硫酸基を導入した PRX(硫酸化 PRX)表面にヘパリン結合性成長因子である骨形成因子(BMP-2)を表面導入することが可能となり、PRX 表面の分子可動性調節と成長因子の表面導入によって骨芽前駆細胞の骨芽細胞分化を強力に促進できることを報告している[2]。そこで本研究では、血管内皮細胞のネットワーク化を促すために新たに成長因子を導入した分子可動性 PRX 表面を設計した。血管内皮細胞のネットワーク化には血管内皮細胞成長因子(VEGF)による RhoA の活性化が寄与していることが知られており[3]、PRX 表面の分子可動性調節と VEGF の表面導入によって相乗的な RhoA の活性化が期待できる。今回、分子可動性の異なる硫酸化 PRX 基板に VEGF を表面導入し、分子可動性調節と成長因子の表面導入がヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)のネットワーク化に与える影響について報告する。
【実験】 硫酸化 PRX 表面を作製するために、硫酸化 PRX トリブロック共重合体を合成した。α-CD と PEG からなる PRX の両末端にアンカーリング部位としてポリベンジルメタクリレート(PBzMA)を配した PRX トリブロック共重合体を合成した。この PRX トリブロック共重合体の α-CD 部位を硫酸化した後、ポリスチレン製基材表面に被膜することで硫酸化 PRX 表面を作製した。この表面に VEGF 溶液を加え、静電的相互作用を介して VEGF の表面導入を行った。細胞の形態や増殖を経時的に顕微鏡観察し、転写共役因子 YAP の細胞内局在評価、RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った。
【結果と考察】 硫酸化 PRX 表面を用いて HUVEC の細胞培養を行ったところ、α-CD 貫通数の多い PRX 表面(低分子可動性表面)は HUVEC の細胞増殖を促進し、α-CD 貫通数の少ない PRX 表面(高分子可動性表面)はその増殖を抑制した。また低分子可動性 PRX 表面は、RhoA 活性化によって惹起される YAP の細胞核移行を促進する傾向があった。これらの結果より、低分子可動性 PRX 表面は血管内皮細胞の増殖および RhoA 活性化に有利な表面であることが示唆される。さらにこの低分子可動性 PRX 基材に VEGF を表面導入したところ、遊離の VEGF を添加した群と比較して血管内皮細胞接着分子(PECAM-1)や血小板由来増殖因子(PDGF)の遺伝子発現量が増加し、HUVEC が長く連なったネットワーク構造の形成が促された。一方で、VEGF を表面導入した高分子可動性 PRX 表面は HUVEC のネットワーク構造の形成が抑制された。これらの結果は、PRX 表面の低分子可動性と VEGF の表面導入による相乗的な RhoA の活性化が血管内皮細胞のネットワーク化を効果的に促進したことを示唆している。

【参考文献】[1] J. H. Seo, S. Kakinoki, T. Yamaoka, N. Yui, *Adv. Healthcare Mater.,* **2015**, 4(2), 215. [2] Y. Arisaka, N. Yui, *J. Biomater. Sci.,Polym. Ed.,* **2017**, 28(10-12), 974-985. [3] M. Ohgushi, M. Minaguchi, Y. Sasai, *Cell Stem Cell.*, **2015**, 17(4), 448-61.

Enhancement of vascular network formation by modulating molecular mobility of polyrotaxane and immobilizing growth factors

Katsuya HYODO[1,2], Yoshinori ARISAKA[2], Satoshi YAMAGUCHI[1], Tetsuya YODA[1], NobuhikoYUI[2]
[1]Department of Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
[2]Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel:+81-3-5803-5500, Fax:+81-3-5803-5500, E-mail:k-hyodo.mfs@tmd.ac.ip

2P-014

純チタン金属表面上に析出させたナノ構造がインプラント埋入周囲歯周組織に与える影響

[1]大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座，[2]大阪大学産業科学研究所先端ハード材料研究分野
○Zeng Yuhao[1]，小正　聡[1]，Yin Derong[1]，Chen Luyuan[1]，吉峰茂樹[1]，関野　徹[2]，岡崎定司[1]

【緒言】近年，材料のナノ化や様々な形態を利用し，従来にない新しい機能を見出そうとする研究が盛んに進められている．共同研究者により，室温での濃アルカリ溶液中反応において純チタン金属表面から酸化チタンナノシート（TNS）が直接形成することが見出された．このような低次元ナノ構造体は，生体適合性材料への応用展開が期待される．顎骨内に埋入されたインプラントが良好な状態を維持するためには、インプラント体への早期機能負担および長期的咬合支持が重要となる.そのためには,オッセオインテグレーション獲得までの期間は早期であることが望ましい.オッセオインテグレーションの獲得期間短縮にはインプラント体の表面性状が関与し,その構造は細胞接着・硬組織への分化誘導に影響を与えるという報告がある．本研究では、純チタン金属を 10M の水酸化ナトリウム水溶液に室温・大気開放圧力下で 24 時間攪拌・浸漬することで表面に TNS 構造を析出させ、インプラント埋入周囲組織にどのような影響を与えるのか in vitro および in vivo 評価を行ったところ興味ある知見を得られたので報告する。

【実験】実験材料として＃2000 まで研磨した市販の純チタン金属表面、純チタン QCM センサおよび純チタンスクリューを使用し，実験群として TNS を析出させたものを，対照群として研磨した純チタンを使用した．TNS の析出には，各試料を 10 M の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し，攪拌した状態で室温・大気圧条件下で 24 時間反応させた．その後，試料を取り出し，イオン交換水にて導電率が 5　μS 以下になるまで洗浄を行った．その後，自然乾燥させ，各種材料表面に TNS を析出させた.試料表面の表面構造を SEM、SPM にて観察、表面の元素分析を XPS にて行った.また、各群表面の蒸留水の接触角を接触式表面形状システム（TalysurfPGI1240）にて測定した．生後 7 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から骨髄間葉細胞を採取後，3 代目を実験に供した．培養開始 1，3，6，24 時間の各群における細胞接着数の比較、培養後 14，21 日後の ALP 活性および 21 日後のオステオカルシンの産生量およびカルシウムの析出量および各種硬組織分化誘導に関する遺伝子マーカーを測定した．また，培養開始 1，3，6，24 時間後のウシ血清アルブミンの吸着量について比較・検討した．実験群および対照群の純チタン金属スクリューを生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの大腿骨に埋入後，4 および 8 週間生育したのち安楽死させ、大腿骨を摘出後、Micro-CT により CT 画像を撮影した．CT 画像をソフトウェアにて解析し、BV/TV、Tb.N、Tb.Sp、Tb.Th を算出した．各測定値は Student の t 検定により統計解析を行い、有意水準は 5%とした.

【結果と考察】SEM 分析および SPM の所見では、対照群で滑らかな像が観察されるのに対し、アルカリ処理を施した実験群ではナノレベルのネットワークノジュール構造が観察された．XPS の解析では、実験群で深い酸化膜の層を形成し、C1s のピークが下がっていることが明らかとなった。全ての計測時間で細胞接着，ALP 活性，オステオカルシン産生量，カルシウム析出量，Runx2 mRNA の発現が有意に高い値を示した．CT 画像の観察をしたところ、４，8 週間共に実験群で海綿骨内の新生骨の著しい形成を認めた．ソフトウェアによる解析結果では、埋入後 4 週で対照群と比較して実験群で BV/TV および Tb．Th の有意に高い値を示し、埋入後 8 週ではすべての指標において実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。これは表面解析の結果より示した実験群材料表面における C1s ピークの減少に起因すると推察される.
以上の結果により、濃アルカリ処理を施した純チタン金属表面が in vitro および in vivo レベルでインプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導に大きな影響を与えることを明らかにした.

Influence of alkali-modified titanium surface on implant surrounding tissue

Zeng Yuhao[1]，Satoshi Komasa[1]，Yin Derong[1]，Chen Luyuan[1]，Shigeki Yoshimine[1]，Tohru Sekino[2]，Joji Okazaki[1]
1Department of Removable Prosthodontics and Occlusion, Osaka Dental University
2 ISIR-SANKEN, Osaka University
Tel: +81-070-1789-2017, Fax: +81-864-3134, E-mail: zeng-y@cc.osaka-dent.ac.jp

2P-015

真空熱処理エピガロカテキンガレート結合ゼラチンの生体内分解挙動と細胞接着性の解明

[1]大阪歯科大学口腔インプラント学講座、[2]大阪歯科大学中央歯科研究所、
[3]京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル学講座
○黄 安祺[1]、本田 義知[2]、高 蓓媛[1]、田中 知成[3]、馬場 俊輔[1]

【緒言】インプラント治療の成否に繋がる骨欠損治療に向け、優れた骨補填材の開発が精力的に行われている。一方、緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート（EGCG）は、*in vitro* においては種々の間葉系前駆細胞に対し優れた骨芽細胞分化能を示す事が報告されていたものの、*in vivo* での骨形成応用法は未だ確立されていない。近年演者らは、EGCG をゼラチンに化学結合させたスポンジ状材料（EGCG-GS）およびその真空加熱物（vhEGCG-GS）を開発し、vhEGCG-GS が優れた骨再生能を示す事を報告した。しかし、その生体内挙動の詳細な解明には至っていない。本研究は、vhEGCG-GS の骨形成機序解明の一端として、ラット頭蓋臨界骨欠損モデルと免疫組織学的評価を用いて、同スポンジの生体内分解挙動の解明を試みたので報告する。

【実験】EGCG-GS は、 豚皮膚由来タイプ A ゼラチンと EGCG を用い水中合成法で作製し、その後 150 度 24 時間真空熱処理を施し、vhEGCG-GS を得た。また、機序解明のためゼラチン単体（以下 GS）、真空熱処理を施した GS（以下 vhGS）を作製し用いた。材料学的評価には、走査型電子顕微鏡およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いた。各材料の骨形成能は、8 週齢の SD 系雄性ラットの頭蓋冠に形成した直径 9 mm の臨界骨欠損に、試料を埋入し評価した（実験群）。また非埋入群を対照群とした。埋入 1、4 週間後、頭蓋冠を採取し、免疫組織学的評価を行い、残留ゼラチン量及び、ゼラチンの分解に関わるマトリックスメタロプロエアーゼ（以下 MMP）-2、-9 の発現挙動を半定量的に評価した。各群 4 匹で実験を行った。また、*In vitro* においてリコンビナント MMP-2、-9 を用いた各材料の分解実験を行った。更に上記材料上における骨芽細胞様細胞株 UMR-106 の細胞増殖挙動を評価した。統計学的評価には、一元配置分散分析と Tukey 法を用いた。

【結果と考察】vhGS で最も強い炎症及び MMP-2、-9 の発現が認められた。EGCG-GS、vhEGCG-GS では炎症が軽減するとともに、MMP-2、-9 の染色強度が下がった。vhEGCG-GS が最も緩やかな分解挙動を示した。細胞培養実験の結果、 vhEGCG-GS において有意な細胞増殖が認められた。EGCG は MMP の機能を阻害し、真空加熱はゼラチン間に熱架橋を施しゼラチンスポンジの頑健性を高める事が知られている。また、緩やかな担体分解挙動は細胞に足場を提供することが知られている。これらの知見と、本研究の MMP 群の生体内発現挙動、*In vitro* での分解実験、細胞培養実験の結果を考慮すると、vhEGCG-GS の緩やかな分解挙動は、EGCG の存在と、真空熱処理による熱架橋の総合的な効果であり、同分解挙動は、vhEGCG-GS の骨形成を向上させる一助となっている可能性が示唆された。

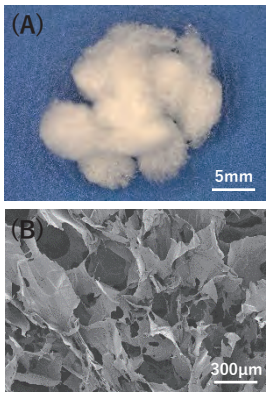


Figure1:真空熱処理カテキンゼラチンスポンジマクロ画像(A)、走査型電子顕微鏡画像(B)

Evaluation of biodegradation mechanism and cell adhesion on vacuum heated epigallocatechin gallate-modified gelatin sponge

Anqi Huang[1], Yoshitomo Honda[2], Beiyuan Gao[1], Tomonari Tanaka[3], Shunsuke Baba [1]
[1]Department of Oral Implantology, Osaka Dental University [2] Institute of Dental Research, Osaka Dental University [3] Department of Biobased Materials Science, Kyoto Institute of Technology
Tel: +81-72-864-3040, E-mail: huanganqident@gmail.com

2P-016

プロタミン担持リン酸カルシウムを用いた新規知覚過敏抑制材の開発

[1] 明治大学理工学部，[2] 鶴見大学歯学部，[3] マルハニチロ株式会社
○藤木　政志[1]，早川　徹[2]，山本　雄嗣[2]，小泉　大輔[3]，外川　理絵[3]，庵原　啓司[3]，相澤　守[1]，本田　みちよ[1]

【緒言】歯周病や加齢による歯肉の退縮で露出した歯根象牙質は、口腔内の pH の低下によって表面成分が溶解し、象牙細管の開口を引き起こす。この象牙細管の開口部に刺激が伝わることにより、象牙質知覚過敏症 (知覚過敏) が発症する。現行の知覚過敏の治療材には、象牙細管を物理的に封鎖するリン酸カルシウム系材料が用いられており、知覚過敏の抑制効果を示している。一方、象牙質はエナメル質より耐酸性が低いため、う蝕原生菌による脱灰、いわゆるう蝕になりやすい。しかし、現行の治療材にはう蝕を防ぐための抗菌効果は備わっていない。そこで本研究では、リン酸カルシウムを用いた象牙細管封鎖材料に抗菌性を付与することにより、知覚過敏の抑制効果とともに抗菌効果も発現することができる新規歯科材料の創製を試みた。なお、抗菌性の付与には、抗菌性タンパク質であるサケ白子由来プロタミン (マルハニチロ株式会社) を用いた。本発表では、プロタミンを担持したリン酸カルシウム粉体の材料特性および、代表的なう蝕原生菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する抗菌性評価を実施した結果について報告する。

【実験】プロタミン溶液 (1000 μg/cm^3) 45 cm^3 と湿式粉砕を施した無水リン酸水素カルシウム (DCPA) 粉体 1.5 g を 50 cm^3 チューブに加え、48 h 撹拌することにより、DCPA 粉体にプロタミンを担持した。なお、DCPA 粉体に担持したプロタミン量は HPLC によって測定した。また、材料の特性評価として、ナノ粒子径粒度分布測定装置による粒度分布の測定及びメジアン径の算出およびゼータ電位測定システムによる材料の表面電位の測定を実施した。一方、抗菌性の評価に関しては、コロニーカウント法による菌数の測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) による細菌の観察、LIVE/DEAD®*Bac*Light™Bacterial Viability Kit による細菌の生死判定を実施した。具体的には、プロタミン溶液の *S. mutans* に対する抗菌性は、プロタミン (0, 125, 250, 500 μg/cm^3) 含有培地中で *S. mutans* を 18 h 培養することで評価した。また、プロタミン担持 DCPA 粉体の表面における抗菌性の評価には、粉体を加圧成形して作製したディスク(直径 15 mm, 高さ 2 mm 程度) を用いた。24 well plate に設置したディスク上に *S. mutans* を播種し、6 h 培養した後、ディスクの表面に付着した *S. mutans* を SEM で観察した。さらに、培養液上清中の *S. mutans* を LIVE/DEAD 試薬で染色した後、蛍光顕微鏡で観察し、細菌の生死判定を実施した。

【結果と考察】プロタミンを担持した DCPA 粉体には 6.7 mg/g のプロタミンが担持されていた。一方、プロタミン担持 DCPA 粉体のメジアン径は約 1.6 μm であり、開口した象牙細管に入り込むことが可能なサイズであることがわかった。また、DCPA 粉体の表面電位はプロタミンの担持量に伴い増加していた。続いて、プロタミン溶液の *S. mutans* に対する抗菌性の評価を行ったところ、プロタミン濃度依存的に菌数は減少し、処理濃度 500 μg/cm^3 では 0 μg/cm^3 に対して菌数が 1%以下にまで減少した。さらに、ディスク上で *S. mutans* を培養し、その表面を SEM により観察した結果、プロタミン担持 DCPA ディスク上では、プロタミンを担持していない DCPA ディスクに比べ、接着した細菌数が減少していた。また、培養液上清中の細菌を LIVE/DEAD 試薬で染色し、観察したところ、プロタミン担持ディスクとともに培養した場合では死菌数が増加した。これは、ディスクから溶出したプロタミンが *S. mutans* に対し、抗菌性を発現した結果であると考える。以上の結果より、本研究で作製したプロタミン担持 DCPA 粉体は、開口した象牙細管を封鎖するとともに、担持したプロタミンにより材料表面および周辺環境において *S. mutans* に対して抗菌効果を発現する新規歯科材料として有用であることが示された。

Development of novel hypersensitivity inhibitor using protamine-loaded calcium phosphate

Masashi FUJIKI[1], Tohru HAYAKAWA[2], Takatsugu YAMAMOTO[2], Daisuke KOIZUMI[3], Rie TOGAWA[3], Keishi IOHARA[3], Mamoru AIZAWA[1], Michiyo HONDA[1]
[1] School of Science and Technology, Meiji University, [2] Department of Dental Engineering, Tsurumi University School of Dental Medicine, [3] Maruha Nichiro Corporation
Tel: +81-44-934-7210, Fax: +81-44-934-7906, E-mail: michiyoh@meiji.ac.jp

2P-017

歯槽骨再生を目指した硫酸化ポリロタキサン/骨形成因子複合体の骨誘導能評価

[1] 東京医科歯科大学　生体材料工学研究所　有機生体材料学分野，[2] 東京医科歯科大学大学院　医歯学総合研究科　顎顔面外科学分野
○寺内　正彦[1,2]，田村　篤志[1]，山口　聰[2]，由井　伸彦[1]

【緒言】近年、エナメルマトリックスデリバティブを主成分としたエムドゲインや、b-FGF が配合されたリグロスなど歯槽骨再生を目的として臨床応用されているが、これらは限局した歯槽骨欠損が適応であり、広範な歯槽骨再生を必要とする症例では自家骨移植に頼らざるをえない。一方で、BMP-2 が有する強力な骨誘導能に期待した骨再生療法の検討が以前から行われているが、生理的条件下での速やかな失活、多量投与による副作用の懸念から臨床応用への課題は多く存在する。当研究室では、これらの課題を改善すべく、超分子ポリロタキサン (PRX) を用いた骨再生療法へのアプローチを進めている。PRX は α-Cyclodextrin (α-CD) に Poly(ethylene glycol) (PEG) が貫通したネックレス構造を有しており、α-CD は非共有結合的に軸上に束縛されているため、軸に沿った可動性を示す。この α-CD の可動性が分子間相互作用における立体障害を改善することで、タンパク質との結合乗数を亢進することを報告してきた (*J. Am. Chem. Soc.* 125, 13016-13017, 2003.)。BMP-2 と静電複合体を形成するために、α-CD 部位に硫酸基を修飾した硫酸化 PRX (S-PRX) を合成し、In vitro 試験での骨分化誘導能を評価してきた。その結果、S-PRX はその硫酸基の修飾数に関わらず、優位な骨分化誘導能を認めた (*Macromol. Biosci.* 15, 953-964, 2015.)。本報告では、S-PRX と BMP-2 の静電複合体が有する骨分化誘導能に関して、S-PRX を形成する PEG 分子量間での比較検討を行った。

【実験】分子量: 2,200 (2k), 4,550 (5k), 9,810 (10k)の 3 種類の PEG に対し、α-CD 貫通率や硫酸基の修飾率をほぼ一定とした S-PRX を合成した (*J. Biomed. Mater. Res. A.* 105, 1355-1363, 2017.)。In vitro 評価として、マウス由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を BMP-2、ヘパリン/BMP-2 複合体及び、各 S-PRX/BMP-2 複合体にて処理し、骨分化マーカーである Alkaline phosphatase (ALP) 活性能、骨分化関連遺伝子発現量 (Runx2, osterix) 及び、Alizarin red 染色にて評価した。In vivo 試験では、5 週齢・雄の ICR マウス頭頂骨上に直径 3.5mm に生検用パンチにて頭蓋骨欠損モデルを作製し、S-PRX/BMP-2 複合体溶液を浸したアテロコラーゲンスポンジを欠損部に埋入し、マイクロ X 線 CT 測定及び、Hematoxylin-Eosin 染色にて骨形成量を評価した。

【結果と考察】各サンプル処理 3 日後の ALP 活性を評価したところ、PEG 分子量に関わらず、S-PRX 複合体はヘパリン/BMP-2 複合体よりも優位な活性を認めた。処理 7 日目での Runx2 及び、osterix 遺伝子発現量は 2k-S-PRX/BMP-2 が最も高い値を示した。さらには、Alizarin red 染色においても 2k-S-PRX/BMP-2 複合体で処理した細胞は、14 日目からの石灰化を認めたが他群では染色を確認されなかった。よって、in vitro においては軸分子量の小さい PEG を用いた S-PRX が骨分化促進に有効であると言える。一方、in vivo では、各 S-PRX/BMP-2 複合体を移植した頭蓋骨欠損マウスは、術後 4 週でヘパリン/BMP-2 複合体及び BMP-2 単体を移植したマウスよりも優位な骨形成能を示した。これらは分子量に関わらず、すべての S-PRX/BMP-2 複合体に優位な骨様組織の形成を認め、Hematoxylin-Eosin 染色においては既存骨と新生骨の骨癒合を認めるだけでなく、新生骨内に骨髄様組織の形成が確認された。以上の結果から、S-PRX は PEG 分子量に関わらず、BMP-2 の骨誘導能を増強する有望な高分子材料として期待される。

Polyelectrolyte complex of BMP-2 with sulfonated polyrotaxane for enhancing bone regeneration

Masahiko Terauchi[1,2], Atsushi Tamura[1], Satoshi Yamaguchi[2], Nobuhiko Yui[1]
[1]Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University [2]Department of Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8022, Fax: +81-3-5280-8027, E-mail: terauchi.org@tmd.ac.jp

2P-018

過酸化水素処理によるチタン表面ナノ構造の制御

[1] 河南科技大学材料科学与工程学院，[2] 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科，[3] 岡山大学工学部
○Yaming Wang[1]，岡田　正弘[2]，矢部　淳[2]，Guangxin Wang[1]，尾坂　明義[1,3]，松本　卓也[2]

【Introduction】Numbers of surface treatment have been developed to enhance the biocompatibility of titanium implants. Among them, the H_2O_2 oxidation treatment is simple and can form titania gel on the titanium surfaces.[1)] From a surface engineering point of view, the H_2O_2 oxidation treatment can also induce the formation of nanostructured surfaces on titanium. However, the effect of H_2O_2 oxidation treatment conditions on the surface nanostructure of titanium remained unknown.

Herein, we report the effects of H_2O_2 oxidation treatment conditions (*i.e.*, temperature and solution composition) on the surface nanostructure of commercially pure titanium (CP-Ti).

【Materials and Methods】Cp-Ti films (20 μm in thickness) were washed three times with acetone followed with pure water in an ultrasonic bath for 5 min. The CP-Ti films were immersed in a 3 mass% H_2O_2 solution in a pressure-resistant vessel, heated at 80–150°C for 1 h, and then thermally treated at 400°C for 1 h in the air. In order to dope several kinds of cations, 3 mass% H_2O_2 solutions containing 100 mM chloride salts were also used for the oxidation treatments. The surface was observed by using a scanning electron microscope (SEM). The crystal phases were determined from X-ray diffraction (XRD) patterns.

【Results and Discussion】Figure 1 shows SEM photographs of the CP-Ti surfaces after the H_2O_2 oxidation treatments at different conditions (before thermal treatment at 400°C). A honeycomb-like nanostructure was formed at above 100°C, and the cell size of the honeycomb-like nanostructure increased by increasing the treatment temperature (Figure 1a), which should be due to the elevated dissolution–precipitation process. Note that there was no significant changes in each nanostructure after calcination at 400°C, and amorphous titania transformed into crystalline anatase after calcination.

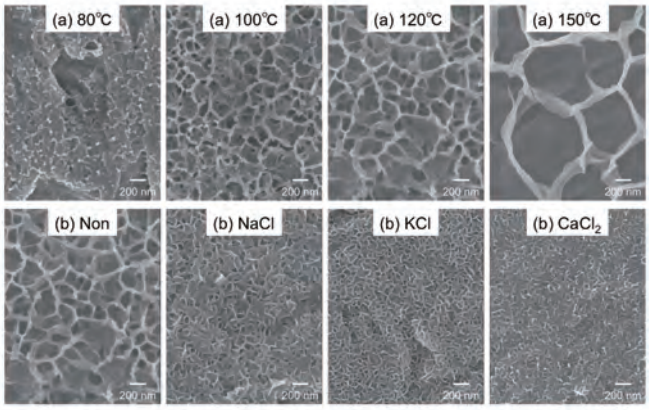


Figure 1. SEM photographs of the CP-Ti surfaces after the oxidation treatments using 3 mass% H_2O_2: (a) without chloride salts at different temperature; (b) with 100 mM chloride salts at 120°C

The surface nanostructure was also changed significantly in the presence of chloride salts (Figure 1b). At the same treatment temperature (120°C), small mesh-like structure was formed after the treatment, and the mesh size was the smallest in the case of $CaCl_2$. The dissolution behavior of titanium in H_2O_2 solution is influenced by the type of chloride salts[2)] and the dissolution–precipitation process prevented in the presence of chloride ions.

【References】

1) X.X. Wang, S. Hayakawa, K. Tsuru, A. Osaka, J. Biomed. Mater. Res., 2001; 54: 172-8.
2) C. Ohtsuki, H. Iida, S. Hayakawa, A. Osaka, J. Biomed. Mater. Res., 1997; 35: 39-47.

Control of surface nanostructure on titanium by H_2O_2 oxidation treatment

Yaming Wang[1], Masahiro Okada[2], Atsushi Yabe[2], Guangxin Wang[1], Akiyoshi Osaka[1,3], Takuya Matsumoto[2] ([1]Department of Materials Science & Engineering, Henan University of Science and Technology, China; [2]Department of Biomaterials, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University; [3]Faculty of Engineering, Okayama University)
Tel/Fax: +81- 86-235-6666, E-mail: m_okada@cc.okayama-u.ac.jp

2P-019

炭酸アパタイト製骨補填材の実用化を見据えた薬事許認可取得

株式会社ジーシー
○山本　克史，園田　秀一，熊谷　知弘

【緒言】
弊社は、九州大学石川邦夫教授との共同研究により、骨補填材の成分としては、新規成分である炭酸アパタイト製の骨補填材の開発に成功した。
本品は、生体内で用いるにあたり、高い品質と安全性が要求された。また、動物を用いた性能評価により、当品の吸収および吸収部位への新生骨形成を実証した。さらに、徳島大学宮本教授らによる治験（国の承認を得るための成績を集める臨床試験）を経て、歯科用骨補填材としては初めて、すべての歯科用インプラントに係る適応を取得した。
本発表では、新規成分である炭酸アパタイト製骨補填材の実用化を見据えた薬事許認可取得までの流れについて報告する。

【製品の概要】

製品名	ジーシー　サイトランス　グラニュール（承認番号：22900BZX00406000）
一般的名称	吸収性歯科用骨再建インプラント材（クラスⅣ）
特徴	本品の最大の特徴は、生体骨と類似した組成である炭酸アパタイトを成分としていることである。これにより、本品を骨欠損部位に補填すると、骨が線維性結合組織の介在なしに本品と結合する（骨伝導性）。また、生体骨と同様に骨のリモデリングによる当品の吸収および吸収部位への新生骨形成が期待される。
使用目的又は効果	歯科領域（口腔外科、歯周外科等）で使用される骨補填材である。既存品の適用である上下顎骨・歯槽骨の骨欠損の補填、インプラント体埋入時にインプラント体が露出した部分の補填に加えて、インプラント体の埋入を前提とした二期的再建時の骨補填（母床骨のみではインプラント体の固定が得られない場合の待時埋植）ならびにインプラント体の埋入と骨補填を同時に実施する骨補填に適用可能である。

【薬事許認可取得までの流れ】
実用化にあたり、まず初めに、生体内埋植材料としての高い品質を保ち、なおかつ大量に合成可能な製造方法の確立に取り組んだ。製造方法の確立後、ＰＭＤＡ（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）との各種相談・協議を経て、品質を担保するための評価項目を設定し、本品の品質を担保した。以降、すべての評価は品質が担保されたサンプルを用いて行った。安全性に関しては、厚生労働省通知（ガイドライン）に従い、本品に対して要求されるすべての生物学的安全性試験を実施し、安全性を担保した。性能に関しては、本品の吸収性を鑑みた性能評価及び実臨床に則した評価を行い、ＰＭＤＡとの各種相談・協議を経て、性能担保に至った。臨床評価に関しても、同様にＰＭＤＡとの各種相談・協議の結果、歯科用インプラントフィクスチャとの併用による治験を実施し、本品の有効性及び安全性を実証した。

【考察】
本品の開発には、２００４年からの探索とスクリーニングも含めると１４年を費やし、２０１７年１２月１４日に薬事承認を得た。長い年月を費やしたものの結果的には、ＰＭＤＡの相談を積極的に活用し、担当者間での協議を行うことで、実用化に至ることができた。本品の実用化が、患者のＱＯＬ向上の一助となることを期待する。

Regulatory approvals in anticipation of practical use of bone substitute material made of carbonate apatite.

Katsushi Yamamoto, Hidekazu Sonoda, Tomohiro Kumagai
GC CORPORATION
Tel: +81-3-3965-1856, Fax: +81-3-3965-1493, E-mail: katsushi.yamamoto@gc.dental

2P-020

L–アルギニンキャリアとしてのポリグリセロールデンドリマーの分子設計

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻
○酒元　竜，大谷　亨

近年、従来のがん治療法に変わる新たな治療法として、がん免疫療法が注目されている。とりわけ、免疫チェックポイント阻害剤による治療や、免疫細胞療法に関する研究が広く行われている。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤では、一般に一種類の経路しか阻害できない点が課題であり、樹状細胞を用いた免疫細胞療法では、がん抗原の発現が必須となることが不可欠である。従って、これらの方法以外のがん免疫療法の検討は、新たな治療法を提案できる点で価値がある。われわれは、これらの問題点を克服し得るがん治療法として、アルギニンデリバリーによるがん免疫療法に着目している。免疫細胞の１つであるマクロファージは、L-アルギニン(L-Arg)を代謝し一酸化窒素(NO)を産生することでがん細胞を死滅させるという機構を有している。長崎らは、L-Arg を共有結合によりポリマー化することでミセルを形成し、EPR 効果による受動的ターゲティングによって効果的に L-Arg をマクロファージへデリバリーすることを考案している [1]。われわれは、L-Arg をデリバリーするキャリアとして、生体適合性に優れかつナノサイズのポリグリセロールデンドリマー(PGD)に着目している(Fig. 1a)。これまでに、PGD は純水中で L-Arg と極めて高い結合定数(10^6 M^{-1})で結合することを見出し、L-Arg デリバリーの可能性がある分子としての予備的知見を得ている [2]。しかしながら、血清中や細胞内環境下での L-Arg 保持性は十分とはいえない。さらに、マクロファージへのターゲティング性の付与も不可欠であるため、これらの課題を克服することが極めて重要である。そこで本研究では、血清などの高塩濃度・高タンパク質濃度条件下においても L-Arg を PGD へ保持させるため、PGD の構成原子密度を増加させることを試みた。PGD と L-Arg の相互作用は、PGD のエーテル酸素と L-Arg のグアニジノ基による静電的相互作用、及び、PGD 内部に存在する疎水場との疎水性相互作用によるものと考えられるため、NaCl 存在下では、Na^+ が PGD 内部に入り込むことで静電的相互作用を阻害していると推測される。Na^+侵入の抑制と PGD 内部の疎水性の増加を目的に、4 つの OH 基から枝分かれを増加させた 4-arm PGD の合成を行った(Fig. 1b)。現在、得られた 4-arm PGD と L-Arg との生理的条件下での相互作用を評価している。当日は、これらの結果とマクロファージへの標的指向性を付与するための化学修飾の成果についても報告する予定である。

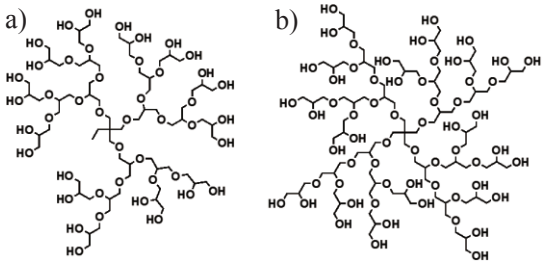


Fig. 1 Chemical structure of a) 3-arm PGD and b)4-arm PGD

【参考文献】

1) Kudo, S.; Nagasaki, Y., *J. Controlled Release* **2015,** *217*, 256-262.
2) Ooya, T.; Lee, H., *ChemNanoMat* **2015,** *1*, 264-269.

Molecular Design of Polyglycerol Dendrimers as a L-Arginine Carrier

Ryu Sakemoto, Tooru Ooya
Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University
Tel: +81-78-803-6255, Fax: +81-78-803-6255, E-mail: ooya@tiger.kobe-u.ac.jp

2P-021

グリオブラスト―マ細胞における 5-ALA 応答不均一性に関する検討

[1] 福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻，[2] 福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構
○米田　滉平[1]，末　信一朗[1,2]，藤田　聡[1,2]

【緒言】近年，悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ(GBM)の診断および治療において，5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた光診断や光治療が注目されている。5-ALA は正常細胞では酸化的リン酸化により，ヘムタンパク質へと代謝される。しかし腫瘍細胞では，ATP 産生はワールブルグ効果により酸化的リン酸化ではなく，解糖系ドミナントにおこなわれるため，投与された 5-ALA は，代謝経路途中のプロトポルフィリン IX (PPIX)として蓄積される。このように腫瘍細胞に選択的に蓄積された PPIX を，UV で励起させた赤色蛍光分子として利用するのが 5-ALA の光診断や光治療である。これは腫瘍細胞のみを識別・治療できるため GBM の新しい治療戦略として大いに期待されているがごく最近になり，5-ALA が投与された腫瘍細胞の PPIX 蛍光強度には細胞間の不均一性があることが報告されている。また，転移した GBM には 5-ALA 陽性の症例と陰性の症例があり，陰性の症例の方が癌の進行度が高いことも報告されている。これらのことから考えると，5-ALA 投与で蛍光陰性を示す細胞は，腫瘍細胞の中でもワールブルグ効果の影響が小さく，酸化的リン酸化の活性が高い細胞であり，効率的に ATP が生産されているために，移動性が高い細胞であるという可能性が考えられた。そこで，本研究では，5-ALA 陽性細胞と陰性細胞との移動性および蛍光強度をシングルセルレベルで定量的に解析することにした。ここでは，脳組織中での細胞の移動性を評価するために，脳組織の繊維状の構造を模倣したナノファイバー基材を用いることにした。

【実験】GBM 細胞株の U-251 細胞を 5-ALA 存在下で平面 dish 上に 1.0×10^3 cells/cm^2 の密度で播種し，シングルセルのタイムラプス観察を行った。細胞の蛍光強度と遊走速度を定量化した。また，ポリ 3-ヒドロキシ酪酸-3-ヒドロキシヘキサン酸共重合体(PHBH)ナノファイバー上に 5-ALA 存在下で細胞を播種し，細胞の蛍光強度と遊走性を同様に評価した。PHBH ナノファイバーはエレクトロスピニング法を用いて作製し，あらかじめ酸素プラズマ処理しておいた。また，酸化的リン酸化阻害剤 Oligomycin および Rotenon 存在下で，同様にタイムラプス観察を行い，ミトコンドリア活性と細胞の移動性の関係に関しても評価をおこなった。

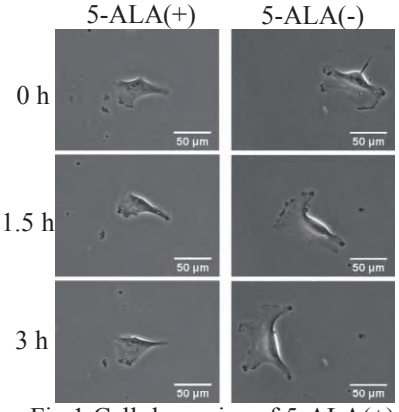


Fig.1 Cell dynamics of 5-ALA(+) cells and 5-ALA(-) cells

【結果および考察】5-ALA 陰性細胞は 5-ALA 陽性細胞よりも移動速度が大きかった(Fig. 1)。また，ファイバー上でも遊走速度と蛍光強度の関係性を調べると，陰性細胞の方が遊走速度が大きかった。また，酸化的リン酸化阻害剤 Oligomycin および Rotenon 存在下で，5-ALA 陰性細胞は大きく移動する際に，酸化的リン酸化の ATP を用いていることが示唆された。本結果は 5-ALA の治療有効性にも直結する結果であるため，さらなる慎重な検討をおこなう必要がある。腫瘍細胞は悪性度が進行するにつれ，周囲との細胞間接着を緩め，高い運動能を獲得する細胞へと変異する。変異した細胞は基底膜を破り，周囲の組織へ移動することで癌の浸潤･転移が開始する。癌の悪性度と移動性の関係については十分な理解がなされておらず，5-ALA 応答性と移動性についての知見が得られれば，GBM の治療戦略への利用も期待される。

Analysis of heterogeneity of glioblastoma cells in response to 5-aminolevulinic acid

Kohei YONEDA[1], Shin-ichiro SUYE [1,2] and Satoshi FUJITA[1,2]
[1] Department of Frontier Fiber Science and Technology, University of Fukui, [2] Life Science Innovation Center, University of Fukui
Tel: +81-776-27-9969, Fax: +81-776-27-8747, E-mail: fujitas@u-fukui.ac.jp

2P-022

Silver nanoparticles affect the cellular response of Tumor Necrosis factor-α

○ Alaa Fehaid (Presenter) [1, 2, 3], and Akiyoshi Taniguchi[1, 2]

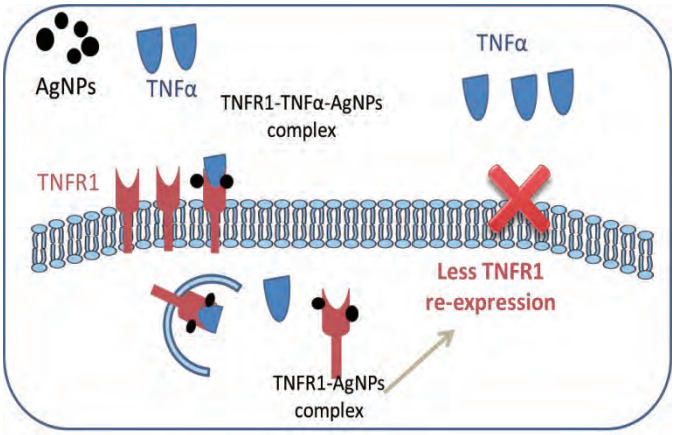
1. Cellular Functional Nanobiomaterials Group, National Institute for Materials Science, Japan
2. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.
3. Forensic Medicine and Toxicology Department, Faculty of Vet. Med., Mansoura Uni., Egypt

TANIGUCHI.Akiyoshi@nims.go.jp , AHMED.Alaa@nims.go.jp

Introduction: Silver nanoparticles (AgNPs) have been used in many products because of its anti-inflammatory properties. Tumor necrosis factor-α (TNFα) is a pro-inflammatory cytokine which is an early marker in cell inflammation; also, it induces apoptosis by different pathways. It is very important to know the molecular mechanism of the cellular response to control the NPs-cells interaction. Therefore, our study aimed to investigate the effect of of AgNPs on the cellular response of TNFα and to determine the molecular mechanism of its effect.

Method & results: Lung epithelial cell line was exposed to AgNPs (5µg/ml) and/or TNFα (20 ng/ml) for 24 h, the cytotoxic effect of AgNPs has been analyzed showing an increase in the cytotoxic effect by increasing the concentrations of AgNPs. Then, flow cytometric assay has been established; our results showed that the cellular uptake of AgNPs has been significantly increased in presence of TNFα. Also, AgNPs significantly decreased the apoptotic effect of TNFα. Confocal microscopy results revealed that Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) localized inside the cells with very few receptors scattered on the cell membrane of the cells exposed to both AgNPs and TNFα while the receptors were homogenously distributed on the cell membrane in control cells and cells exposed to TNFα only indicating that AgNPs affect the localization of TNFR1.

Conclusion: Our study concluded that the low concentration of AgNPs showed an anti-apoptotic effect against the apoptosis induced by TNFα. Also, we provided a new possible mechanism of the anti-apoptotic effect of AgNPs by its effect on the TNFα receptor1.



Silver nanoparticles affect the cellular response of Tumor Necrosis factor-α

○ Alaa Fehaid [1, 2, 3], and Akiyoshi Taniguchi[1, 2]

1.Cellular Functional Nanobiomaterials Group, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan

2.Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.

3.Forensic Medicine and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Egypt

TANIGUCHI.Akiyoshi@nims.go.jp, AHMED.Alaa@nims.go.jp

2P-023

マクロファージの生物機能に与える培養基材物性の影響

京都大学　ウイルス・再生医科学研究所

○森岡　智子，城　潤一郎，田畑　泰彦

【緒言】

細胞は，生理活性物質などの化学刺激だけでなく，基材の硬さなどの力学的な性質にも影響をうけ，その挙動を変化させることが知られている．本研究の目的は，細胞培養基材の硬さが細胞挙動に与える影響を調べることである．本研究では，ゼラチンを化学架橋することで，硬さの異なるゼラチンハイドロゲルを作製した．それらのゼラチンハイドロゲル基材上で培養されたマクロファージの挙動を調べた．

【実験】

異なる濃度のゼラチン（重量平均分子量 100,000, 等電点 5.0, 新田ゼラチン株式会社より供与）の水溶液を調製し，濃度の異なるグルタルアルデヒド（GA）水溶液を添加して，ゼラチンハイドロゲルを作製した．グルタルアルデヒドの重量は，ゼラチンの重量に対して 1 wt%となるようにした．得られたゼラチンハイドロゲルを 37℃の 2 回蒸留水中で 3 日間膨潤させた後，圧縮測定を行い，得られた応力-ひずみ曲線の直線部分の傾きから弾性率を計算した．また，異なる弾性率をもつゼラチンハイドロゲル上にマクロファージを播種し，培養した後，細胞接着数とサイトカインの産生について調べた．

【結果と考察】

ゼラチン水溶液の濃度の増加とともに，ゼラチンハイドロゲルの弾性率は増加した．弾性率増加の理由として，単位体積あたりに存在するゼラチンの分子数が増加し，架橋点がより多くなったことが考えられる．また，異なる弾性率をもつゼラチンハイドロゲル上でマクロファージを培養したところ，ゼラチンハイドロゲルの弾性率に関係なく，いずれのゼラチンハイドロゲルにも，細胞が接着，増殖することがわかった．発表では，ゼラチンハイドロゲルの硬さがサイトカインの産生に与える影響ついても報告する．

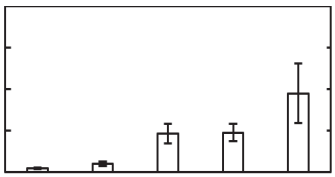


図. 異なるゼラチン水溶液の濃度で作製したハイドロゲルの弾性率（GA 濃度：ゼラチン水溶液濃度 5, 7, 10, 12 および 15 wt%に対して，5, 7, 10, 12 および 15 nM）

Effect of culture substrate property on the biological function of macrophages

Tomoko MORIOKA, Jun-ichiro JO, and Yasuhiko TABATA

Department of Regeneration Science and Engineering, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University. Kyoto 606-8507, Japan

Tel: +81-75-751-4128, Fax: +81-75-751-4646, E-mail: morioka.tomoko.42n@st.kyoto-u.ac.jp

2P-024

がん組織環境に応答してタンパク質医薬を放出しうる多重刺激応答性ハイドロゲルの調製

東理大院基礎工[1]・阪大院工[2]
○多湖萌野[1]・茅野英成[1]・麻生隆彬[2]・石原量[1]・菊池明彦[1]

[緒言] 近年，がん化学療法に抗体医薬に代表されるタンパク質医薬品が強力な治療効果を発現する治療薬として利用されている[1]。しかし，生体内ではタンパク質の失活や分解が生起すると，薬効の低減や標的部位への送達効率が低下する。そこで，タンパク質を安定に内包しつつ，標的部位で放出可能な薬物送達キャリアとして，高含水性で生体適合性のハイドロゲルは有用と考えられる。ハイドロゲルを外部刺激に応答させ，自身の機能を変化させることができれば，薬物内包効率の向上や，放出の引金として用いることが可能になる[2]。さらに，DDS キャリアは内包物を放出後に分解し体外へ排泄されることが望ましい。そこで還元環境下で分解性を示すジスルフィド結合に注目した。当研究室では架橋部位にジスルフィド結合を導入し，還元環境下で分解するハイドロゲルを報告している[3]。本研究では，温度，pH，還元環境，の各刺激に応答可能なハイドロゲルを調製し，タンパク質の固定・放出メカニズムを検討することを目的とした。この概念を **Fig. 1** に示す。

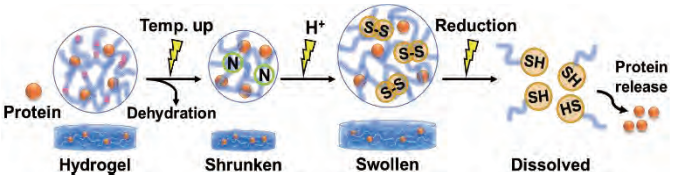


Fig. 1 Schematic image of thermo-, pH- and reduction-responsive hydrogel and stimuli-responsive protein release.

[実験] ポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル (PEGDE)とシスタミン (CA)を NaOH 水溶液中で反応させハイドロゲルを調製した。ディスク状に成形したゲルを PBS (pH 7.4)，もしくは PB (pH 5.0-8.4)中に浸漬し，10-45ºC での膨潤度を算出した。さらに，3 mmol L^{-1} ジチオトレイトール(DTT)含有 PB 溶液中での分解試験を実施した。最後に，タンパク質内包ゲルを調製し，還元環境下での放出試験をした。タンパク質は，蛍光標識したウシ免疫グロブリン G (FITC-IgG) (MW = 150,000, p*I* 7.2), ウシ血清アルブミン (FITC-BSA) (MW = 66,000, p*I* 4.8), インスリン (FITC-Insulin) (MW = 5,700, p*I* 5.4)を用いた。

[結果と考察] 調製したハイドロゲルの複数刺激にともなう膨潤収縮挙動を調べた。ハイドロゲルは pH 7.4 で昇温とともに収縮した。これは，ハイドロゲルが親水性で短鎖長の PEG と比較的疎水性の CA から成るためと考えられた。酸性環境下で膨潤度が大きくなった。得られたハイドロゲルは CA 由来の三級アミノ基を含むため p*K*a を 6.21 (37 ºC)に有し，酸性環境下でアミノ基がプロトン化にともない吸水し，浸透圧の増大により膨潤したと考えられる。さらに，DTT 溶液中では，ゲルは崩壊し完全に水溶性化した。すなわち，三次元網目構造中にジスルフィド結合を導入することで，還元環境下で崩壊するゲルを調製できた。次に，温度変化にともなう膨潤収縮挙動を利用し，タンパク質内包ハイドロゲルを調製したところ，ディスクゲル 1 枚あたりのタンパク質内包量は，IgG < BSA < Insulin であり，タンパク質分子量の低下にともない内包量は多くなった。**Fig. 2** に BSA の放出挙動を示す。PB(pH 5.4)中では BSA を放出しなかったのに対し，3 mmol L^{-1} DTT 含有 PB 溶液中では，1 h 以内にすべて放出された。すなわち，酸性環境下ではハイドロゲルが正，BSA が負に帯電することから，静電相互作用によりタンパク質を内包・保持する一方，還元環境に応答してタンパク質を放出することがわかった。したがって，がん細胞周辺環境の酸性環境下においてはタンパク質を安定に内包し，がん細胞内環境に応答して放出しうることを示す。以上より，調製したハイドロゲルは，温度，pH，および還元環境応答性を示し，刺激に応答した膨潤収縮挙動を利用してタンパク質を安定に内包かつ，がん細胞内環境において放出可能な DDS キャリアとして応用が期待できる。

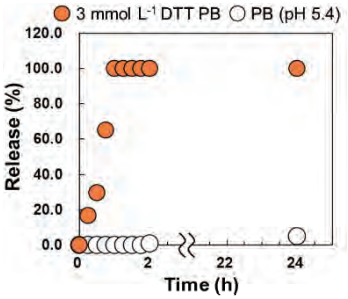


Fig. 2 Release of BSA from disk-gels in PB and 3 mmol L^{-1} DTT PB solution.

[参考文献] [1] P. R. Hari *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1996**, 59, 1795-1801. [2] P. Gupta *et al.*, *Drug discovery today*, **2002**, 7(10), 569-579. [3] K. Yamawaki *et al.*, *Coll. Surf. B.*, **2016**, 146, 343-351.

Preparation of multistimuli-responsive hydrogels capable of releasing protein drugs in response to tumorous tissue

Moeno TAGO[1], Hidenari KAYANO[1], Taka-Aki ASOH[2], Ryo ISHIHARA[1], Akihiko KIKUCHI[1], ([1]Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo University of Science, 6-3-1 Niijuku, Katsushika-ku, Tokyo 125-8585, Japan, [2]Dept. Appl. Chem., Osaka University, Suita, Osaka, Japan, Tel: +81-3-5876-1415, Fax: +81-3-5876-1639, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

2P-025

ATP 応答性ナノ集合体の調製と DDS キャリアへの展開

[1] 関西大化学生命工，[2] 関西大 ORDIST
○土谷　平[1]，河村　暁文[1,2]，宮田　隆志[1,2]

【緒 言】近年，さまざまな疾患に応じて発現量が変化する生体分子が報告されており，新たなバイオマーカーとして注目されている。例えば，アデノシン三リン酸（ATP）は細胞内に存在しており，細胞運動やタンパク質合成などの幅広い生体内反応に使用され，アデノシン二リン酸（ADP）に分解される。通常，細胞内の ATP/ADP 比は一定に保たれているが，細胞へのストレスにより変化することが報告されている。そのため，細胞内 ATP/ADP 比の変化を認識して応答する材料は，細胞ストレスを感知する新規なスマートバイオマテリアルとして期待される。そこで，本研究では ATP に応答するナノ集合体の創製を目的として，可逆的付加開裂連鎖移動（RAFT）重合により，親水性ブロックと側鎖にチミンを有する疎水性ブロックとを有する両親媒性ブロック共重合体を合成した。また，得られたブロック共重合体を用いて自己集合体を調製し，ATP の添加によるナノ集合体の応答について検討した。

【実 験】 まず，poly(ethylene glycol) methacrylate（M_n: 1,020; PEGMA）と 4-cyano-4-(thiobenzoylthio) pentanoic acid，4, 4-azobis(4-cyanopentanoic acid)（ACVA）を用い，RAFT 重合により PPEGMA マクロ RAFT 剤を合成した。続いて, PPEGMA マクロ RAFT 剤と ACVA を用いた vinylbenzyl thymine（VBT）の RAFT 重合により PPEGMA-*b*-PVBT を合成した。得られた PPEGMA-*b*-PVBT を dimethyl sulfoxide に溶解させ, 水に対して透析することにより PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体を形成させた。動的光散乱法（DLS）により，さまざまな ATP 濃度における PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体の粒径を測定し，その ATP 応答挙動を評価した。さらに、モデル薬物として Rhodamine 6G をナノ集合体に内包させ，ATP に応答したナノ集合体からの放出挙動を検討した。

【結果・考察】^{1}H NMR 測定の結果, 得られた PPEGMA-*b*-PVBT の PPEGMA ブロックおよび PVBT ブロックの重合度はそれぞれ 55 および 157 であることがわかった。動的光散乱測定および透過型電子顕微鏡観察より，このブロック共重合体を用いて調製したナノ集合体は水中で 150 nm 程度の球状の集合体を形成することがわかった。また，この PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体は生理的イオン強度であるリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）中においても水中と同程度の粒径を維持することができた。さらに，この PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体分散液に ATP を添加すると，ナノ集合体の粒径が増加した。これは，ナノ集合体コアに存在する PVBT ブロックのチミン部位と高い親水性を有する ATP とが相互作用することにより，PVBT ブロックの親水性が増加して疎水性相互作用が低下するためと考えられる。

Fig. 1 には，Rhodamine 6G を内包した PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体を PBS(-)および 50 mM の ATP を含む PBS(-)中に分散させた際のナノ集合体からの Rhodamine 6G の放出挙動を示した。図より，PBS(-)中では Rhodamine 6G の放出が抑制され，ATP 存在下では放出が有意に増加していることがわかる。PVBT ブロックのチミン部位と ATP との相互作用により PVBT ブロックの疎水性相互作用が低下するため，PPEGMA-*b*-PVBT ナノ集合体に内包された Rhodamine 6G の放出速度が ATP 存在下で大きくなったと推察される。

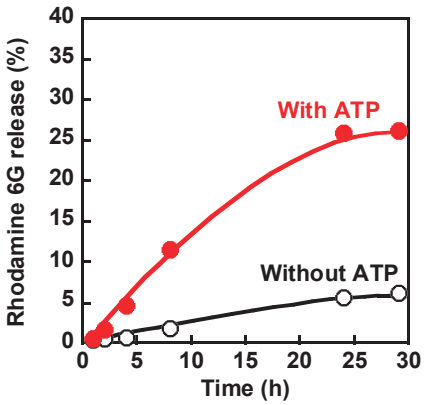


Fig. 1. Release profiles of Rhodamine 6G from PPEGMA-*b*-PVBT nano-assemblies in PBS(-) with (●) and without 50 mM of ATP (○).

Preparation of ATP-Responsive Nano-assemblies for DDS Carriers

Taira Tsuchiya[1], Akifumi Kawamura[1,2], Takashi Miyata[1,2]
[1]Fac. of Chem., Materials and Bioeng. and [2]ORDIST, Kansai Univ., 3-3-35, Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan. Tel: +81-6-6368-1978, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: akifumi@kansai-u.ac.jp

2P-026

ペプチド・高分子複合体による脂質膜の形態制御：共重合体のアンカリング効果

東京工業大学生命理工学院
○竹中智香、落合拓郎、嶋田直彦、丸山厚

【緒言】 インフルエンザ融合タンパク質であるヘマグルチニンの N 末端部位を模倣した E5 ペプチドは酸性条件下において両親媒性のα-helix 構造を形成し、会合体となって膜破壊機能を発現する [1,2]。当研究室では、Poly(allylamine)-*graft*-Dextran (PAA-*g*-Dex)が静電相互作用により E5 と可溶な複合体を形成し、中性条件下で E5 を α-helix 構造へと転移させ、膜破壊を誘起することを見出した [3]。さらに、E5/PAA-*g*-Dex 複合体を GUV (Giant Unilamellar Vesicle)(組成比 0.2 mol% Rhodamine labeled-DOPE, 0.2 mol% PEG2k-DSPE, 99.6% DOPC)に作用させるとベシクルからシートへの構造転移が誘起された (Fig. 1)[4]。この構造転移を利用することで、生体内への薬物デリバリーへの応用、脂質ベシクル・シート変換型デバイスとしての機能化が期待される。また脂質シートについて、ある時間経過後にベシクルへと復帰する現象(時限応答)も確認できている。これは脂質シートの親・疎水界面を安定化している E5/PAA-*g*-Dex 複合体の膜からの解離によると考えられ、デバイス化に向けてこれを制御することが重要と考える。そこで、本研究では脂質膜に修飾可能な疎水性のアシル基を導入した PAA-*g*-Dex を合成し、PAA-*g*-Dex の脂質膜上への搭載と脂質シート構造の安定化を目指した。

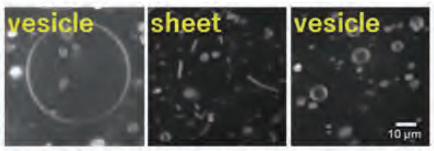
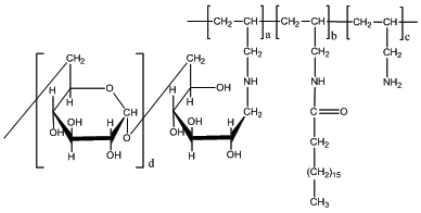


Fig 1. The confocal microscopy images of lipid membrane structures changed from vesicles to sheets by E5/PAA-*g*-Dex and spontaneously back to vesicles.

【実験方法】 ステアリン酸のカルボキシ基と PAA-*g*-Dex のアミノ基を PyBOP により縮合し、ステアリル(SA)基導入率の異なる PAA-*g*-Dex-SA (PD-xS: SA 基導入率 x mol%)を合成した (Fig. 2)。SA 基導入率は ^{1}H NMR 測定から計算した。PD-S が脂質膜表面上に修飾されていることを評価するために、SUV (Small Unilamellar Vesicle)を用いて表面ゼータ電位を測定した。蛍光標識した GUV 懸濁液に濃度の異なる PD-S を混合し、インキュベートにより PD-S の脂質膜表面修飾を行った。さらに E5 添加後、脂質構造の経時変化を観察した。


Fig 2. The structure of PAA-*g*-Dex-SA

【結果と考察】 ^{1}H NMR 測定から PD-2S, PD-8S の調製を確認した。表面ゼータ電位測定結果から、PD-xS 未修飾 SUV と比較して、PD-2S, PD-8S とインキュベートした SUV 表面はより正に帯電した。以上より、脂質膜表面に修飾するために十分な SA 基を PAA-*g*-Dex に導入できたことを確認した。PD-xS (x=0, 2, 8)はいずれも E5 とともに GUV をベシクルからシートへと構造変化させたが、SA 基導入率によって、脂質シートの形成能と安定性に違いが見られた。まず、SA 基導入率が高くなるほど、より低濃度の PD-xS において高いシート形成能を示し、また形成されたシートの寿命も長くなった。これは、SA 基により PAA-*g*-Dex がより多く膜上に分配し、さらに E5 の膜への分配を促した結果と考えられる。実際に、蛍光顕微鏡観察からベシクル復帰後も PD-S が脂質膜上に保持されていることが確認できた。以上より、SA 基を導入することで PAA-*g*-Dex の結合が安定化され、シート形成性やその安定性を制御できることがわかった。

参考文献 1) M. Murata, et al., Ohnishi, J. Biol. Chem. 1991, 266, 14353. 2) M. Murata, et al., Biophys. J. 1993, 64, 724. 3) N. Shimada et al., J. Controlled Release 2015, 218, 45. 4) N. Shimada et al., in preparation.

Controlling lipid membrane structures from vesicles to sheets with peptide/copolymer complex : the effect of anchoring copolymers on membranes

Tomoka Takenaka, Takuro Ochiai, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama
School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
Tel: +81-45-924-5762, E-mail: amaruyama@bio.titech.ac.jp

2P-027

S/O/W 型アジュバントによる抗原提示細胞の活性化と抗原送達能の向上

[1] 九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門, [2] 九州大学 次世代経皮吸収研究センター, [3] 九州大学 未来化学創造センター
○水野 梨瑚[1], 田原 義朗[1], 若林 里衣[1,2], 神谷 典穂[1,2,3], 後藤 雅宏[1,2,3]

【緒言】

ワクチンとは病原体由来の抗原を体内に投与し、抗原特異的な免疫を活性化する医薬品である。多くのワクチンは抗原とアジュバント（免疫を活性化する効果をもった添加剤）から構成されており、これらを高効率に免疫細胞に送達する様々なデリバリーシステムが報告されている。しかしながら、その多くはヒトへの効果や安全性の問題で、実用化に至っていないというのが現状である。一方でOil-in-Water（O/W）型エマルションアジュバントは実用化されており、ヒトでの安全性が保障されているが、水溶性の抗原とO/Wエマルションが別々に投与されているため、免疫細胞への抗原とアジュバントの同時送達が難しい。そこで本研究では、水溶性タンパク質の油中ナノ分散化技術（Solid-in-Oil化技術）を利用して、O/Wエマルションの Oil相に抗原をナノサイズで分散した Solid-in-Oil-in-Water（S/O/W）型エマルションアジュバントの創製を試みた。更に、親油性の toll-like receptor（TLR）リガンド分子、R848 を Oil 相に組み込むことで、相乗的な免疫活性の向上を狙い、新規免疫 DDS キャリアとしての応用を目指した（**Fig.1**）。



Fig.1　S/O/W エマルションの概念図

【実験】

S/O/W のサンプルは **Table1** の組成で調製した。PBS で 10 倍に希釈したのち遠心分離（20℃、20,000g、15 min）を行った。水相の 7 割を培地置換し、これをさらに 5 倍希釈して RAW 細胞に投与した。比較対象として、同様の組成からなる O/W+OVA サンプルを用意した。この際 OVA 濃度について、S/O/W サンプルにおける抗原封入率や培地置換の影響を加味したうえで、0.1 mg/g とした。

Table1　調製時のサンプル組成

	FITC-OVA	EPC	Span85	Squalene	Tween80	R848
S/O/W	0.02	0.5	0.5	4	0.5	0.002 (20μg/g)

（単位:wt%、PBS中）

マウス由来抗原提示細胞（RAW 細胞）を 2.0×10^5cells/mL となるように培地で希釈し、12well プレートに各 2 mL/well ずつ播種しインキュベートした。24 時間後、上記のように作製したサンプルを用いて、前日に播種したプレート内の培地を交換した。更に 24 時間後、FACS による分析を行った。7AAD を用いて死細胞を除去し、PE-I-Ad（MHC class Ⅱ）抗体、PECy7-CD40 抗体、APC-CD80 抗体を標識抗体として用いた。

【結果と考察】

CD40 と CD80 を共発現した活性化細胞において、抗原とアジュバントを別々に投与したサンプル（O/W+OVA）と比較し、S/O/W エマルションの方が OVA のデリバリー能が向上することが確認された（**Fig. 2**）。以上より、S/O/W エマルションの抗原とアジュバントを同時封入している性質により、活性化した抗原提示細胞に効率よく抗原をデリバリー可能であり、強力な抗原提示を促進できることが示唆された。

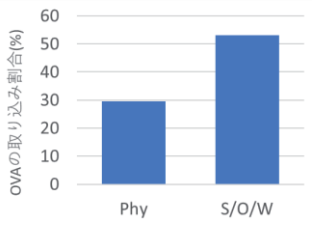


Fig. 2 抗原提示活性化評価

Improvement of APC activation ability using solid-in-oil-in-water adjuvant

Riko Mizuno[1], Yoshiro Tahara[1], Rie Wakabayashi[1,2], Noriho Kamiya[1,2,3], Masahiro Goto[1,2,3]
[1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, [2]Center for Transdermal Drug Delivery and [3]Center for Future Chemistry, Kyushu University
Tel: +81-92-802-2808, Fax: +81-92-802-2810, E-mail: mizuno.riko.822@s.kyushu-u.ac.jp

2P-028

ヒアルロン酸被覆高分子ミセルによる肝星細胞への選択的薬物配送

[1] 関西大化学生命工，[2] 関西大 ORDIST, [3] 奈良県立医科大, [4] 関西大医工薬連携研究セ
○永田拓也 [1]，山田莉央 [1]，能﨑優太 [2]，鍛冶孝祐 [3]，吉治仁志 [3]，葛谷明紀 [1,4]，大矢裕一 [1,4]

【緒言】

肝硬変とは慢性的な肝炎などによる肝損傷の修復の際に，過度に活性化した肝星細胞が過剰にコラーゲン線維を産出することで肝臓が硬化する疾病である。肝硬変を治療するための一つの手段として，コラーゲン線維産生を抑制する薬剤(抗線維化薬剤)を肝星細胞に選択的にデリバリーする事が有効であると考えられる。肝星細胞は肝類洞壁内部に存在するため，肝星細胞へ薬物を送達するには，まず肝類洞内皮細胞(LSEC)層への薬剤分布および透過が必要であると考えられる。一方我々はこれまでに，生分解性のポリリシン-ポリ乳酸・AB ジブロック共重合体(PLys$^+$-*b*-PLLA)から調製した表面に高密度の正電荷を有するナノサイズのコア-シェル型ミセルを，負電荷を持つ高分子電解質でポリイオンコンプレックス(PIC)形成により被覆した PIC 被覆ミセルが，通常の高分子ミセルよりも著しく高い希釈安定性を示すことを報告している [1]。特にポリアニオンとしてヒアルロン酸(HA)を選択することにより，LSEC 表面に存在するレセプターによって認識され，HA で被覆したミセルが *in vitro* において LSEC に選択的に取込まれることを見出している [2]。そこで，本研究では，肝星細胞への効率的な薬物配送を目的として，抗肝線維化薬剤を内包した HA 被覆ミセルを調製し，その体内動態や機能評価を行った結果を報告する。

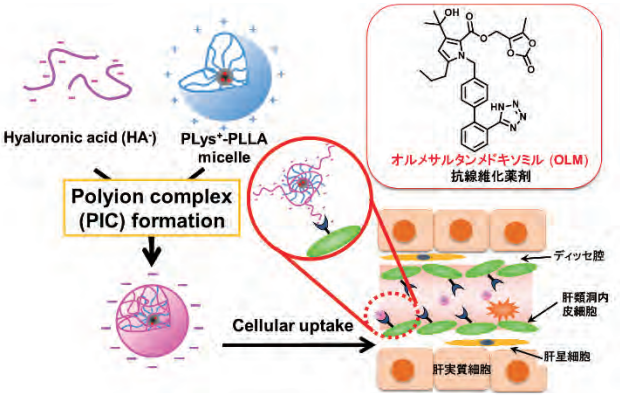


Fig. 1. Schematic illustration for preparation of polyion complex micelles and uptake behavior of it in LSEC.

【実験】

既報に従い合成した PLys$^+$-*b*-PLLA に Texas Red を反応させ蛍光ラベル化した TR-PLys$^+$-PLLA を用いて TR-PLys$^+$-PLLA ミセルを調製した。一方，HA (MW=90,000Da) を 4-amino fluorescein を用いて蛍光ラベル化して Flu-HA を調製した。得られた Flu-HA 水溶液に TR-PLys$^+$-PLLA ミセル水溶液を滴下し，二重ラベル化 HA 被覆ミセルを調製した。対照サンプルとして 4-amino fluorescein を用いて蛍光ラベル化したカルボキシメチルデキストラン (CMDex) で被覆した Flu-CMDex 被覆ミセルも同様に調製した。次に，ヒト不死化肝星細胞株 (LX2) の培養液中に調製したミセルを添加し，共焦点レーザー顕微鏡により細胞取り込みを評価した。さらに，Flu-HA 被覆ミセルをマウスに尾静脈注射し，所定時間後のマウスの臓器をそれぞれ取り出し，生体蛍光イメージング装置を用いてミセルの体内分布評価を行った。

【結果と考察】

調製した Flu-HA 被覆ミセルの LX2 細胞取り込み試験を行った結果，Flu-HA 被覆ミセルを添加した系は Flu-CMDex 被覆ミセルを添加した系と比較して，細胞内に Fluorescein と Texas Red の両方の蛍光が観察され，Flu-HA 被覆ミセルが細胞内に取り込まれていることが分かった。また，尾静脈注射 4 時間後のマウスの各臓器を取り出して生体蛍光イメージング装置を用いて評価した結果，Fluorescein と Texas Red のどちらの蛍光も他の臓器と比べて肝臓が最も高い値を示した。この結果から，Flu-HA 被覆ミセルは肝臓への高い集積性を示すことが示唆された。

1) Y. Ohya *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211,* 1750-1756.
2) Y. Ohya *et al.*, *J. Contr. Rel.* **2011**, *155*, 104-110.

Specific drug delivery to hepatic satellite cells by hyaluronic acid-coated micelles

Takuya Nagata[1], Rio Yamada[1], Yuta Yoshizaki [1,2], Kosuke Kaji [3], Hitoshi Yoshiji [3], Akinori Kuzuya [1, 2,4], Yuichi Ohya [1, 2,4]
[1] Dept. of Chem. Mater. Eng., Kansai Univ., [2] ORDIST. [3] Nara Med. Univ., [4] Collabo. Res. Ctr. Eng. Med. Pharm., Kansai Univ. [1]Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

2P-029

温度応答性高分子とカチオン性高分子の混合ブラシによる温度制御型細胞分離

[1] 慶應義塾大学 薬学部
○若山 暖乃[1]，長瀬 健一[1]，金澤 秀子[1]

【緒言】近年、再生医療の急速な発展に伴い、従来の低分子薬に代わる治療法として細胞移植や細胞シートを用いた治療法に注目が集まっている。細胞を治療に用いる際には他の不要な細胞と分離し精製する必要があるが、現在用いられる分離法では細胞を蛍光色素や磁気ビーズで標識するため、細胞活性の低下や人体への影響が懸念視される。そこで、温度応答性高分子であるpoly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)を用いたラベルフリーでの細胞分離の検討がされている。本研究では、PNIPAAmとカチオン性高分子であるpoly(*N,N*-dimethylaminopropyl acrylamide)(PDMAPAAm)の混合ブラシ修飾ガラス基板を作製し(Fig.1)、温和な温度変化にのみにより細胞の迅速な接着と脱着を制御する新規細胞分離法の開発を目指した。

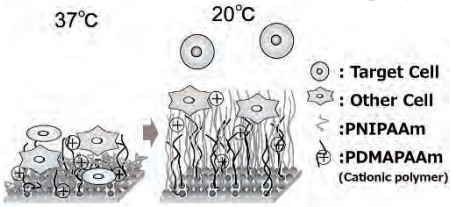


Fig. 1 Cell separation using mixed thermo-responsive and cationic polymer brush

【実験】ガラス基板(24×50 mm)に3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS)とATRP開始剤である(choloromethyl)phenylethyltrimethoxysilaneをシランカップリング反応により固定化し、アミノ基に重合開始剤V-501を反応させて修飾した。その後、1,4-dioxane溶液中でRAFT重合によりPDMAPAAmを修飾し、ATRPによりPNIPAAmを修飾することで、PDMAPAAm、PNIPAAmの混合ポリマーブラシをガラス基板表面に構築した。基板に修飾されたポリマーの分子量を溶液中に生成したポリマーの分子量から推算した。また、ポリマー修飾基板表面及び実験に用いた細胞のゼータ電位を測定した。作製した基板に間葉系幹細胞(MSC)、骨芽細胞(Osteoblast)、子宮頸がん由来細胞(HeLa細胞)、ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を播種し、37℃で6時間インキュベートした際の接着挙動を観察し、その後20℃で3時間インキュベートした際の脱着挙動を観察した。

【結果と考察】作製した基板の全てに分子量10000程度のPNIPAAmが修飾されていることがわかった。RAFT重合におけるDMAPAAmモノマー濃度の上昇に伴い、PDMAPAAmの分子量が増加し、基板表面のゼータ電位の値が大きくなることがわかった。また細胞表面のゼータ電位測定により、MSCとHeLa細胞は強い負電荷を帯び、骨芽細胞は極めて弱い負電荷を帯びていることがわかった。作製した基板において、37℃で負電荷の強いMSCとHeLa細胞を播種したところ、分子量の大きいPDMAPAAm修飾基板において高い接着速度を示した(Fig.2)。これは、基板表面の正電荷と細胞の負電荷の静電的相互作用により接着が促進されたためと考える。また、NHDFはPDMAPAAmの分子量の違いによる接着速度の差は見られず、骨芽細胞はいずれの基板においても接着がほぼ見られなかった。また、37℃での細胞接着後の20℃に温度を変化したところ、接着していたMSCは速やかに脱着したが、HeLa細胞は3時間後も接着を維持していた。

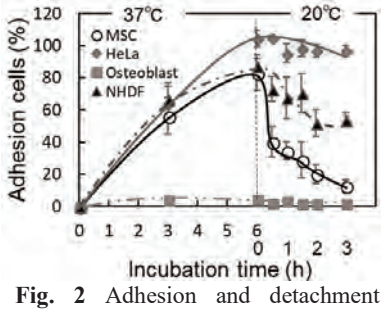


Fig. 2 Adhesion and detachment profiles on long PDMAPAAm and PNIPAAm modified surface

以上の結果より、温度応答性高分子とカチオン性高分子混合ブラシ修飾基板を用いる事で、細胞接着挙動の差を利用した温度制御による迅速なラベルフリー細胞分離の可能性が示された。

Temperature-modulated Cell Separation using Thermo-responsive and Cationic Polymer Brush

Haruno Wakayama[1], Kenichi Nagase[1], Hideko Kanazawa[1]
[1]Faculty of Pharmacy, Keio University
Tel: +81-03-5400-1378, E-mail: nagase-kn@pha.keio.ac

2P-030

ポリアリルアミン/TiO_2ナノ粒子複合体内封リポソームの調製と超音波力学療法効果

[1] 大阪府立大学大学院工学研究科
○露谷 政人[1]，弓場 英司[1]，原田 敦史[1]

【緒言】近年、がん治療において外部刺激を併用した治療技術が注目されている。当研究室では、生体深達度の高い超音波を外部刺激に利用した超音波力学療法に関する研究を行ってきた。これまでに、超音波照射によって活性酸素種（ROS）を生成する二酸化チタン（TiO_2）ナノ粒子とポリアリルアミン（PAA）にポリエチレングリコール（PEG）をグラフト化させた PAA-*g*-PEG からなるポリイオンコンプレックス（PIC）ミセルを細胞に取り込ませた後、超音波照射することにより殺細胞効果が誘導されることを確認している (Biomaterials Science, 1, 65 (2013))。このシステムの更なる改善には、TiO_2ナノ粒子をミトコンドリア近傍へ送達し ROS を発生させることが有効であると考えられる。そこで本研究では、ミトコンドリアへのターゲティング能をもつトリフェニルホスホニウム（TPP）基を導入した TPP-PAA を用い TiO_2ナノ粒子との PIC を作製した。この PIC を pH 応答性高分子修飾リポソーム (Biomaterial, 35, 3091 (2014))によりサイトゾルへ送達し、その後、PIC は TPP 基の効果によりミトコンドリアへ集積し、超音波照射による殺細胞効果の増強が期待される（Fig. 1）。

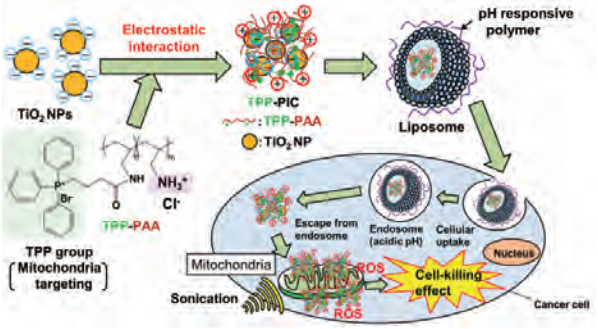


Fig. 1. Schematic image of pH-responsive polymer-modified liposome incorporated TiO_2 nanoparticles/TPP-PAA polyion complexes for sonodynamic therapy.

【実験】TPP-PAA（TPP 基導入率：23%）を TiO_2ナノ粒子と静電相互作用させ TPP-PIC を作製した。脂質薄膜を TPP-PIC を含む水溶液で分散させることによりリポソームを調製した。このリポソームを密度勾配遠心法により分離し、得られた fraction 1~5 の粒子径および透過型電子顕微鏡（TEM）観察を行った。PIC 内封リポソームについて、リポソーム表面に pH 応答性高分子である MGlu-Dex-C_{10} の修飾を行い、ゼータ電位測定を行った。

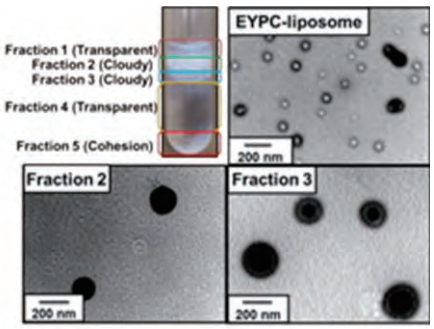


Fig. 2. Purification by density gradient centrifugation and TEM images of empty liposome, fraction 2 and 3.

【結果と考察】PIC 水溶液で脂質薄膜を分散し、密度勾配遠心した結果、5 つの層に分離された（Fig. 2）。各 fraction について、DLS 測定、ICP による Ti 濃度測定および脂質濃度測定を行った結果、fraction 2 及び 3 の Ti 濃度が他 3 つより高かった。そこで fraction 2 及び 3 について TEM 観察を行った。fraction 2 及び 3 は、どちらも 150～200 nm の球状粒子の存在が確認されたが、fraction 3 についてのみリポソーム膜と内水相の界面と推測される相分離した構造（淡色の輪）が確認されたことから、fraction 3 が目的とした PIC 封入リポソームであると考えられる。この fraction 3 の PIC 封入リポソームへ MGlu-Dex-C_{10} の修飾を行った結果、ゼータ電位の低下が確認されたことから pH 応答性高分子の修飾が示唆された。

Preparation of Polyallylamine/TiO_2 Nanoparticle Complexes-Loaded Liposomes

Masato TSUYUTANI[1], Eiji YUBA[1] and Atsushi HARADA[1]
[1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, Sakai 599-8531, Japan
Tel: 072-254-9913, Fax: 072-254-9913, E-mail: mb105064@edu.osakafu-u.ac.jp

2P-031

可逆的性質変化を起こす機能性リポソームの開発

慶應義塾大学大学院薬学研究科
○藤條 惠，根本 遼，綾野 絵理，長瀬 健一，米谷 芳枝，金澤 秀子

【緒言】Polyethylene glycol (PEG)修飾リポソームはパッシブターゲティングによるがん組織への集積に有効な手段である。しかし PEG 修飾リポソームはその安定性のために標的細胞に取り込まれにくく、薬物放出が十分に行われないという欠点が存在する。この欠点を解決するために、熱や pH などの外部刺激に応答する高分子を修飾したリポソームにより、標的組織で薬物放出制御を行う検討がなされている。我々はこれまでに、リポソームの薬物放出や細胞内取り込みへの温度応答性高分子の影響を検討してきた。中でも、カチオン性リポソームに温度応答性高分子を修飾することで薬物放出や細胞内取り込みが促進されることが分かった。さらに本研究では、外部温度変化によるリポソームの性質の可逆変化とそれに伴う薬物放出制御、細胞内取り込み制御を実現する機能性リポソームを開発した(Fig. 1)。

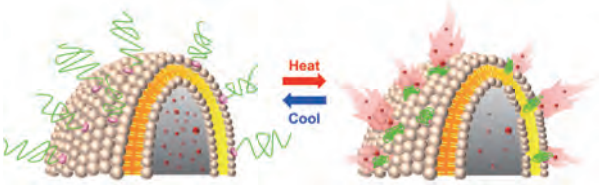


Fig. 1. Schematic image of functional liposome for reversible property changes.

【実験】連鎖移動剤として 3-mercaptopropionic acid (MPA)、ラジカル開始剤として 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN)を用いて *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm)と *N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm)を共重合させ温度応答性高分子を合成した。作製した温度応答性高分子をリポソームに修飾させるためにポリマーのカルボキシ末端を *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)と *N*-hydroxysuccinimide (NHS)を用いてスクシニル化し dioleoylphosphatidyleethanolamine (DOPE)をアンカーとして結合させた。リポソームは薄膜法で作製した。動的光散乱法によりリポソームの温度依存的な粒子径変化を測定した。また、リポソームの各温度での細胞への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果と考察】リポソームに修飾した温度応答性高分子の影響を調べるために、30 ºC から 50 ºC まで 1 ºC 間隔でリポソームの粒子径を測定したところ、40 ºC 付近から粒子径が急激に増大した。また、30 ºC から 50 ºC の範囲で昇温・降温させてリポソーム懸濁液の透過率を測定したところ、昇温過程では透過率は減少し、降温過程では増加した。これは温度応答性高分子が温度変化により親水性から疎水性へと相転移しリポソームの性質が変化したことで、膨張・凝集が起きたためと考えられる。温度応答性高分子の相転移温度以上・以下の温度で粒子径を繰り返し測定したところ、高温では粒子径が大きくなるが低温では小さくなることが確認され、粒子径変化の可逆性が維持されていることが分かった(Fig. 2(a))。また、リポソームの細胞への取り込みを各温度で観察したところ、温度変化による細胞内取り込みの違いが確認された(Fig. 2(b))。以上の結果から、本研究で作製した温度応答性高分子修飾リポソームは温度に応答して可逆的な性質変化を示すことから、それに伴う薬物放出制御、細胞内取り込み制御の可能性が期待される。

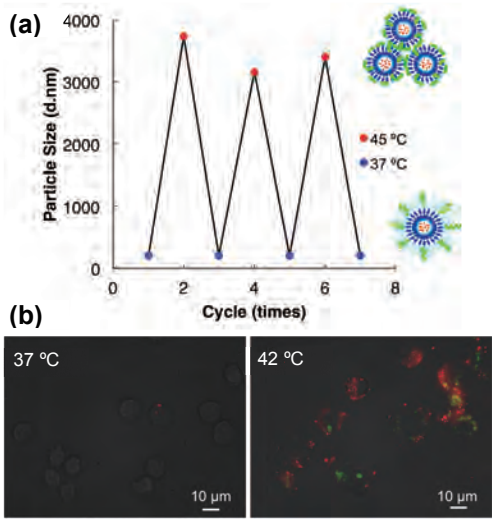


Fig. 2. Reversible particle size changes of liposomes (a) and temperature dependent cellular uptake of liposomes (b).

Development of Functional Liposome for Reversible Property Changes

Kei Fujieda, Ryo Nemoto, Eri Ayano, Kenichi Nagase, Yoshie Maitani, Hideko Kanazawa
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University
Tel & Fax: +81-3-5400-1378, E-mail: nagase-kn@pha.keio.ac.jp, kanazawa-hd@pha.keio.ac.jp

2P-032

多糖のゾル−ゲル転移を利用した温度応答性マイクロ粒子の開発

[1] 東京農工大学大学院工学府応用化学専攻
○佐藤　拓未[1]，村上　義彦[1]

【緒言】薬物治療においては、標的部位をターゲティングすることによって最低限の薬物量で最大限の治療効果を得ることが理想的である。そこで、薬物をキャリアに内包し、生体内での動きを精密に制御する研究が広く行われている。薬物キャリアは、①生体適合性が高いこと、②送達経路に適した粒子径を有していること、③薬物放出能（速効性または徐放性）を有していることが求められ、一般には高分子が素材として用いられる。天然高分子である多糖の一部は、固有の温度において、ゲルからゾル、ゾルからゲルに状態変化する現象（ゾル-ゲル転移）を示す。この現象を利用し、親水性物質が溶解した多糖水溶液と、界面活性剤が溶解した有機溶媒から調製した w/o エマルションを冷却することによって、分散相である多糖水溶液がゲル化し粒子を形成すると考えられる。本研究は、「多糖の性質を粒子の形成、および温度に応答した薬物放出に巧みに利用する」という独自の材料設計アプローチによって調製される新奇の薬物キャリアの開発を目的とした。

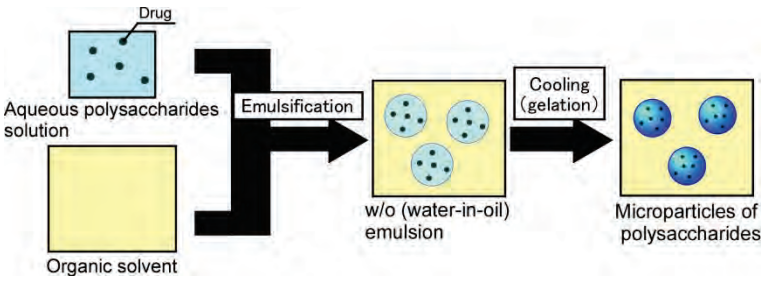


Fig. 1 Formation of temperature-responsive polysaccharides microparticles.

【実験】κ-カラギーナン（5.0 w/v%）および塩化カリウム（32 mM）を用いて調製したゲル（0.3 g）を 80℃で静置することによってゾル状態にした。さらに、トルエン（10 mL）と界面活性剤を混合（80℃）することによって有機溶媒を調製した。これらの溶液を高速撹拌（80℃、16,000 rpm、10 min）することによって w/o エマルションを調製し、水浴中で冷却することによって s/o サスペンションを調製した。得られた s/o サスペンションを自然乾燥することによって粒子を形成した。得られた粒子について、SEM を用いた表面形態の観察および幾何学径の算出、模擬肺を用いた *in vitro* 吸引試験によるエアロゾル特性の評価、FITC-dex の内包および放出挙動の評価を検討した。

【結果と考察】高分子界面活性剤として poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ε-caprolactone) (PEG-*b*-PCL, PEG M_n : 3,500, PCL M_n : 6,000)を用いた場合に高い安定性を示す s/o サスペンション、および約 4 μm の幾何学径を有する表面が凹凸状の粒子が得られた。球形の粒子の形成には、①高分子界面活性が粒子に配向し有機溶媒と明確な界面が作られること、②粒子の内部構造の安定性が高いこと、の二つが重要な因子である。吸引試験の結果から FPF 値が 52.1±7.8%となり、本粒子は高い肺送達能を有している可能性が示された。これは、粒子の表面形態に由来していると考えられる。さらに、FITC-dex の放出試験の結果から 5 分後にほぼ全ての内包物が放出されているため、本粒子は体内付着後に内包物を迅速に放出できる可能性が示された。

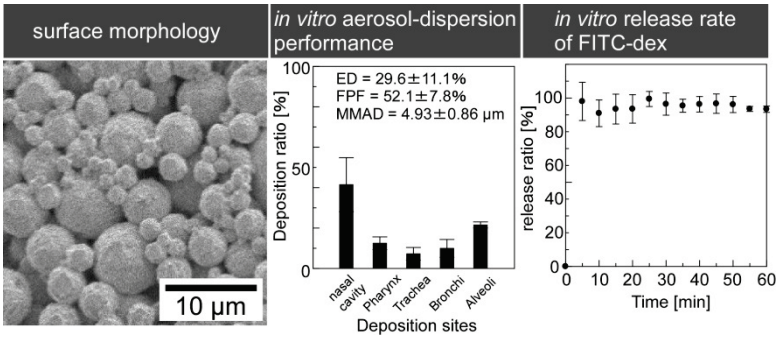


Fig. 2 Physical properties of κ-carrageenan particles.

Development of temperature-responsive microparticles formed via sol-gel transition.

Takumi SATO[1], Yoshihiko MURAKAMI[1]
[1]Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology
Tel/Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

2P-033

液晶性部位を有するケラチンナノ粒子作製と機能化

慶應義塾大学大学院理工学研究科
○伊藤　香，福井　有香，藤本　啓二

【緒言】ケラチンは羽毛、羊毛、毛髪、皮膚、爪など生体中に存在する繊維状タンパク質であり、保水性・抗菌性・生体適合性などの特性を有することからバイオベースポリマーとして注目されている。本研究では、羊毛由来のケラチンを用いてナノ粒子を作製し、内部改質による機能化を試みた。すなわち、液晶性を有する 2 本鎖型カチオン界面活性剤とケラチン鎖とのイオンコンプレックス形成と疎水性会合によるポリマー鎖の集積化によってナノ粒子形成を行った。得られたナノ粒子の内部には、界面活性剤由来の液晶領域が形成されることから、ゲルー液晶相転移(液晶性)による膨潤収縮などの物性発現とそれに伴う物質の封入・放出といった機能発現が期待できる。さらに、ケラチン由来のチオール基と金との親和性を利用して、粒子内に金ナノ粒子(AuNPs)の生成を行い、プラズモン特性を利用した発色、センシング能など機能発現を行った。

【実験】繊維状の羊毛由来ケラチンに変性剤と還元剤を添加し、水素結合とジスルフィド結合の切断によって可溶化を行った。次に、カチオン界面活性剤である Dioctadecyl dimethyl ammonium chloride (DODAC)をケラチン溶液(pH 12)に加え、複合体の形成と集積化を利用して粒子を作製した(Ker-DODAC)。この粒子に酸化剤を添加し、ジスルフィド形成による粒子内架橋を施した(Ker-DODACss)。得られた粒子について種々の pH と温度において、散乱強度測定による粒子の安定性評価と水中粒径測定を行った。また、粒子に疎水性蛍光プローブである 8-Anilino-1-naphtalenesulfonic acid (ANS)を封入し、界面活性剤に由来する疎水場の形成とゲルー液晶相転移挙動の検出を試みた。さらに、封入した ANS について温度変化による放出挙動の検討を行った。次に、Ker-DODAC に $HAuCl_4$ 溶液を添加し、*in situ* 還元を促すことで金複合化を試みた(Ker-DODAC-Au)。得られた粒子について透過型電子顕微鏡(TEM)による形状観察と金含有率の算出を行った。さらに、散乱強度と水中粒径測定によって環境応答性と安定性の評価を行った。

【結果と考察】粒径約 100 nm で、表面電位が-36 mV(pH 12)の Ker-DODAC が得られた。この粒子は、pH 7.4 以上では安定に分散状態を維持したが、pH 5.0 以下では DODAC が脱着することで崩壊がみられた。ジスルフィド架橋を行った Ker-DODACss では、広い pH 領域において粒子形状と分散状態が維持された。これらの粒子内には DODAC 由来の疎水場の形成が確認され、ゲルー液晶相転移に伴い、昇温により疎水場が減少し、降温により上昇した。これに伴って、昇温すると粒子は膨潤し、降温すると収縮した。さらに、昇温による膨潤によって封入物質の放出を促進させることができた。この際、ジスルフィド架橋によって、DODAC の漏出が抑制された。次に、粒子内において金の生成を行ったところ、15~40 nm の球状 AuNPs が得られた。さらに、pH、還元剤の種類と濃度、$HAuCl_4$ 濃度などを変化させることにより、サイズと金含有率を調節することができた。得られた Ker-DODAC-Au は、Ker-DODAC が崩壊する環境条件でも分散状態を維持することがわかった。これは、ケラチン鎖が AuNPs によって架橋(金属架橋)されたことによると考えている。

Design and Synthesis of Keratin Nanoparticles Including Liquid Crystals and Gold Nanoparticles

Kaori ITO, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO
Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: 045-556-1580, Fax: 045-566-1551, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

2P-034

薬物徐放化技術を活用した組織修復性マクロファージの体内誘導

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
○百鳥　直樹，田中　隆介，田畑　泰彦

【緒言】本研究の目的は、体内局所に組織修復性マクロファージを集積させ、組織の再生修復を促す材料を開発することである。マクロファージには、炎症性と抗炎症性の２つの性質をもつサブタイプの存在が知られている。その中で抗炎症性マクロファージは炎症を抑制し、生体組織を修復へと導く作用をもっている。そこで、血中の単球を必要部位へ移動させ、その部位でマクロファージを抗炎症性へと変換させることができれば、生体組織修復を促すことができるであろう。本研究では、単球移動活性をもつ薬物の SEW2871（SEW）、および抗炎症性マクロファージへの変換作用をもつ薬物の pioglitazone（pio）を取り上げた（図 1）。これらの２種類の薬物を徐放化できる材料を調製、その徐放挙動と細胞への作用を調べた。

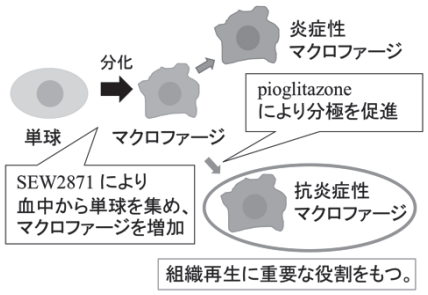


図 1. 抗炎症性マクロファージ動員スキーム

【実験】ゼラチンのアミノ基にコレステリル基を化学導入した疎水性ゼラチンを作製した。この疎水性ゼラチンと難水溶性の SEW を共通溶媒であるジメチルスルホキシド中に溶解させてから、蒸留水に対して透析を行うことで SEW 水可溶化ゼラチンミセルを作製した（SEW-ミセル）。SEW-ミセルの in vitro でのマウス骨髄由来単球の移動活性を、SEW 単体による作用と比較した。

pio のジクロロメタン溶液に乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）を加え、溶解させた。調製した溶液をポリビニルアルコール（PVA）水溶液中に分散させ、溶液を攪拌状態に保ちジクロロメタンを揮発させた後、遠心分離を行い、pio 内包 PLGA 粒子（pio-粒子）を得た。種々の大きさの pio-粒子をマウス骨髄由来マクロファージとともに培養し、抗炎症性マクロファージの指標であるインターロイキン-10（IL-10）産生とアルギナーゼ活性を測定した。

SEW-ミセルおよび pio-粒子を組み込んだゼラチンハイドロゲルを調製した。調製した薬物内包ハイドロゲルからの SEW と pio の徐放を in vitro で評価した。

【結果と考察】ゼラチンとコレステロールの仕込み比を変化させることによってコレステリル基の導入率を変化させることができた。疎水化ゼラチンと SEW の仕込み比を変化させると、ミセルの SEW 内包量が変化した。SEW-ミセルは SEW 単体と同程度の単球移動活性をもつことがわかった。

PVA 水溶液への PLGA および pio のジクロロメタン溶液の投入方法を変えることで、平均粒径が約 300 nm の pio-粒子（pio 内包ナノ粒子）と約 160 μm の pio-粒子（pio 内包マイクロ粒子）を作製した。pio 内包ナノ粒子とともに培養されたマクロファージの IL-10 産生（図 2）とアルギナーゼ活性は、未処理の細胞に比べて、有意に高くなった。これは、pio 内包ナノ粒子がマクロファージに取り込まれ、pio がマクロファージに効率的に作用したためであると考えられる。

作製した薬物内包ハイドロゲルからの SEW と pio の徐放を確認した。

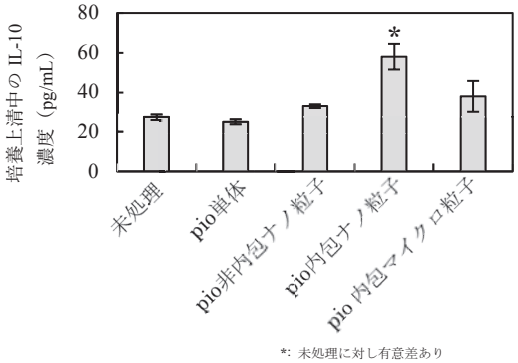


図 2. マクロファージからの IL-10 産生

Biomaterials: In vivo induction of anti-inflammatory macrophages by utilizing drug delivery technology

Naoki MOMOTORI, Ryusuke TANAKA, and Yasuhiko TABATA
Institute for Frontier Life and Medical Science, Kyoto University, Kyoto 606-8397, Japan
Tel: +81-075-751-4867, Fax: +81-075-751-4646, e-mail: momotori.naoki.36u@st.kyoto-u.ac.jp

2P-035

がん細胞を標的とした高機能化タンパク質ナノ粒子による DDS システムの構築

東京工業大学生命理工学院
○矢渕　翼，池田　裕介，眞下　泰正，三重　正和，小畠　英理

【緒言】ドラッグデリバリーシステム（DDS）は、体内における薬物動態を制御するシステムであり、DDS により標的部位への親和性を付与することで薬物投与の最適化が可能となる。近年では、優れた生体適合性に加え、体内で不安定な薬剤を安定化する機能等を有する生体高分子のキャリア（運搬体）の研究が盛んに行われている。細胞外マトリックスの一種であるエラスチンタンパク質をモデルとしたペプチド（Elastin-like polypeptide ： ELP）は、高い生体適合性や生体内における安定性、その疎水性領域に薬剤を内包することが可能であることから、DDS キャリアへの応用が期待されている。さらにこの ELP は、相転移温度を超えると構造を変化させ、巨大な凝集塊を形成する温度応答性を有する。当研究室では先行研究として ELP の疎水性ドメインをモチーフとした温度応答性ペプチド(AVGVP)n と負電荷を有するアミノ酸であるアスパラギン酸のポリペプチドの融合タンパク質を作製した。この融合タンパク質は、ELP の性質による温度に応答して凝集体を形成する際に、ポリアスパラギン酸の静電反発力を利用することで、凝集体のサイズおよび分子配向が制御されたナノ粒子を形成する。本研究では、がん細胞への特異的なデリバリーを目的として、このナノ粒子表面に、がん細胞への標的能と細胞内部移行能を有するペプチドを提示したタンパク質ナノ粒子を構築した。ここでは、細胞接着配列 RGD と組織透過性配列 CendR を組み合わせた環状ペプチド iRGD を遺伝子工学的に ELP とポリアスパラギン酸の融合タンパク質に融合し、高機能タンパク質ナノ粒子を作製した。また、ナノ粒子の物性評価および抗がん剤を内包させたナノ粒子の in vitro での有効性を評価した。

【実験】ナノ粒子を構成する ELP とポリアスパラギン酸の融合タンパク質に iRGD を付加したタンパク質 ((AVGVP)42-D44-GGGS2-iRGD) を遺伝子工学的に作製した。作製したタンパク質において、濁度測定および DLS による粒子径測定を行うことで、このタンパク質の相転移等の物性や粒子形成能を評価した。また、ナノ粒子に蛍光物質である coumarin6(C-6)を内包させ、細胞に添加し、添加後の細胞において共焦点顕微鏡もしくは蛍光顕微鏡を用いて細胞の蛍光を観察することで、がん細胞への特異的な結合さらには細胞内導入を評価した。さらに、ナノ粒子に疎水性の抗がん剤である paclitaxel(PTX)を内包し、がん細胞に添加後、一定時間経過した細胞において Calcein-AM と propidium iodide による細胞染色を行うことで、生細胞数と死細胞数を評価した。加えて、CCK-8 を用いた定量的評価も行った。

【結果と考察】作製したタンパク質は、濁度測定の結果、昇温過程において特定の温度を境に濁度が上昇し、温度応答性を有することが確認された。相転移温度は 38.2℃であり、生体温度付近であった。また、降温過程では濁度がほとんど降下せず、構造変化が不可逆的であり、形成された粒子が構造安定性を保持していることが示された。DLS を用いて粒子径測定を行った結果、加熱後 30nm 前後の粒子を形成していることが明らかとなり、DDS のキャリアとして適切なサイズのナノ粒子を形成することが分かった。また、ポリアスパラギン酸の静電反発力により際限のない凝集を抑えているといえる。ナノ粒子の細胞内導入評価においては、作製したナノ粒子のがん細胞内部移行能が確認できた。コントロールである iRGD を提示していないナノ粒子は細胞に取り込まれておらず、また、iRGD を提示したナノ粒子でも非がん細胞には取り込まれなかったことから、がん細胞に特異的に導入可能であることが示された。さらに、作製したナノ粒子に PTX を内包させることで、がん細胞に特異的に作用し、細胞死を誘導できることが明らかとなった。

Construction of highly functionalized protein nanoparticles for targeting cancer cells

Tsubasa YABUCHI, Yusuke IKEDA, Yasumasa MASHIMO , Masayasu MIE, Eiry KOBATAKE
School of Life science and Technology, Tokyo Institute of Technology
Tel: +81-045-924-5760, Fax: +81-045-924-5779, E-mail: kobatake.e.aa@m.titech.ac.jp

2P-036

卵白アルブミン分泌シグナルペプチドが形成するナノ粒子によるアミロイド線維形成抑制

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科　○和田愛以・和久友則・田中直毅

【緒言】アルツハイマー病は、細胞外におけるアミロイドβ (Aβ) の異常凝集が誘導する神経細胞死によって引き起こされる。細胞毒性の主な原因とされる水溶性 Aβオリゴマーの生成を抑制することができれば、アルツハイマー病の予防や治療に有効であると期待される。我々は、卵白タンパク質の主成分であるオボアルブミン (OVA) の N 末端領域の分泌シグナルペプチド ($pN_{1\text{-}22}$ (acetyl-GSIGAASMEFCFDVFKELKVHH)) に着目した。OVA は、細胞内輸送を受け細胞外に放出される分泌タンパク質の一種である。通常、分泌タンパク質のシグナルペプチドは細胞外に分泌される過程で切断されるが、OVA のシグナルペプチドは切断されずに N 末端領域に存在する。OVA を酸性条件下でペプシン処理すると、N 末端 22-23 残基目の間で特異的な加水分解を受けて、$pN_{1\text{-}22}$ ペプチドが得られる。

本研究では、$pN_{1\text{-}22}$ ペプチドから成るナノ会合体を作製し、得られたナノ会合体が Aβの異常凝集に与える影響について評価した。

【実験】$pN_{1\text{-}22}$ ペプチドをリン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) 中、65°C で 1 時間加熱することでナノ会合体を作製した。その形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察し、表面電荷をゼータ電位測定により評価した。種々の濃度の $pN_{1\text{-}22}$ ナノ会合体存在下、$Aβ_{1\text{-}42}$ の異常凝集の挙動をチオフラビン T (ThT) 蛍光アッセイにより評価した。

【結果と考察】作製した $pN_{1\text{-}22}$ ナノ粒子は、直径 20 - 25 nm の球状の形態をもつことを TEM により確認した。また表面電荷は、-21.95 mV であった。$pN_{1\text{-}22}$ ナノ粒子共存下での $Aβ_{1\text{-}42}$ の凝集過程を ThT 蛍光アッセイにより評価した (Fig. 1)。$pN_{1\text{-}22}$ ナノ粒子存在下では、$Aβ_{1\text{-}42}$ 単独に比べて蛍光強度の立ち上がりまでに要する時間が、$pN_{1\text{-}22}$ ナノ粒子の濃度依存的に増加した。さらに $Aβ_{1\text{-}42}$ の凝集過程をTEMによっても観察したところ、$Aβ_{1\text{-}42}$ 単独では3 h より線維化が認められたのに対して、$pN_{1\text{-}22}$ ナノ粒子存在下では 5 h まで線維の形成が認められなかった。以上より $pN_{1\text{-}22}$ ナノ粒子が $Aβ_{1\text{-}42}$ の凝集を確かに抑制していることが確認された。当日はネットチャージの異なる $pN_{1\text{-}22}$ 改変ペプチドの会合体形成挙動及び、その $Aβ_{1\text{–}42}$の凝集抑制能についても報告する。

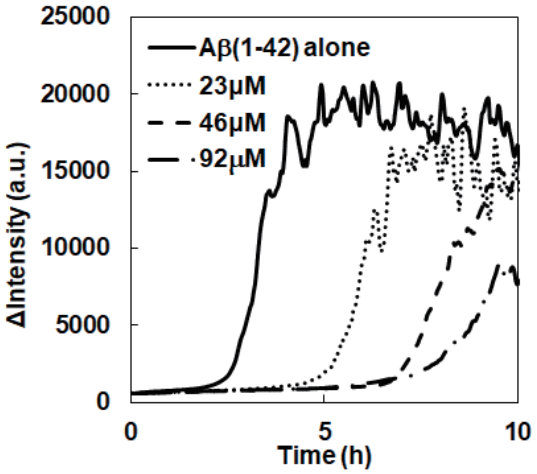


Figure. 1 Time course of ThT fluorescence intensity of 23 μM $Aβ_{1\text{-}42}$ solutions in the presence of $pN_{1\text{-}22}$ nanoparticles (0-92 μM).

Prevention of amyloid fibril formation with nano-assembly formed from signal peptides of ovalbumin.

Mei WADA, Tomonori WAKU and Naoki TANAKA (Factulty of Molecular Chemistry and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan)
Tel: +81-75-724-7861, Fax: +81-75-724-7861, E-mail: tanaka@kit.ac.jp

2P-037

Benzoboroxole 含有ポリマーによる HVJ-E 表面修飾法の開発

[1] 東京工業大学 環境・社会理工学院 融合理工学系, [2] 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点, [3] 筑波大学大学院 数理物質科学研究科, [4] 東京理科大学大学院 基礎工学研究科, [5] 東京工業大学 科学技術創生院 先導原子力研究所
○米岡 修一郎[1], 中川 泰宏[2,3], 荏原 充宏[2,3,4], 塚原 剛彦[5]

【緒言】 HVJ-E(Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope)は膜融合作用や抗腫瘍免疫活性化作用を有することから、有用な非ウイルス性ベクターとして期待されている。一方、HVJ-E には、赤血球に膜融合して溶血を引き起こしてしまうことや、抗腫瘍免疫単独ではガンの根治が難しいことなど、課題が残っている。そこで近年、ポリマー性素材で HVJ-E を被覆する研究や、BNCT(ホウ素中性子捕捉療法)等の他のガン治療法と組み合わせる研究が盛んに進められている。本研究では、膜融合作用を制御する機能と、BNCT 用ホウ素薬剤の機能を併せ持つ新規材料の開発を目的とした。具体的には、pH に応答して糖に結合・解離する性質を有し、かつ、ホウ素原子を有する MAAmBO(methacrylamido benzoboroxole)を含む生体親和性ポリマーを HVJ-E に被覆すると共に、その特性を評価する。MAAmBO は、中性(pH 約 7.4)の血中では HVJ-E 表面の糖鎖に結合し、HVJ-E がポリマーによって被覆されることで溶血が抑制される一方、酸性(pH3～5)のガン組織中では MAAmBO と糖鎖の結合が解離し、ポリマーが脱離するため、HVJ-E の膜融合作用が発現する (Fig.1) 。MAAmBO はホウ素原子を含むため、BNCT 薬剤としての役割を果たすことも可能となる。

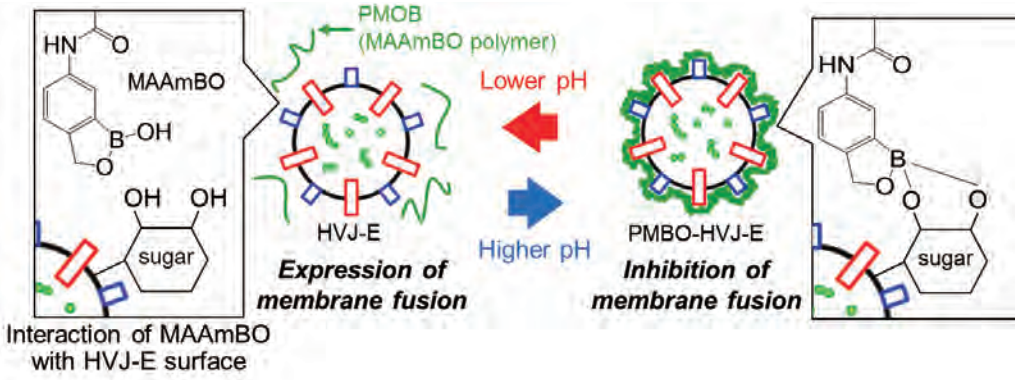


Figure.1: Modification of MAAmBO containing polymer on HVJ-E surface

【実験】 MPC(2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)と MAAmBO の共重合ポリマーPMBO (poly[MPC-*co*-MAAmBO]) を精密ラジカル重合法により合成し、末端を蛍光修飾して PMBO(F)とした。これを pH 6.0, 7.4, 8.0 にそれぞれ調整したリン酸バッファー (PBS) に溶解させ、PMBO(F)溶液を作成した。HVJ-E も同じ pH にそれぞれ調整した PBS に分散させた。同じ pH の PMBO(F)溶液と HVJ-E 分散液を混合して 4 ℃で 40 分間攪拌し、HVJ-E 表面を PMBO(F)で被覆して PMBO(F)-HVJ-E とした。その後、pH 7.4 及び 8.0 の PMBO(F)-HVJ-E 分散液は、遠心濾過によって PBS を除き、新たに pH6.0 の PBS を加えて PMBO(F)を脱離させた。それぞれの被覆・脱離状態は蛍光スペクトルにより評価した。また、同様の手順を用いて PMBO を修飾された HVJ-E を pH 7.4 の PBS にて作成して PMBO-HVJ-E 分散液とした。その後、ニワトリ血液と混合して 37 ℃にて 2 時間インキュベート後、上澄み液の 540 nm における吸光度を UV-Vis 分光装置で測定し、溶血の有無を判断した。

【結果と考察】 蛍光スペクトルから、HVJ-E 表面への PMBO(F)の修飾は pH 7.4 以上で起こることを確認した。また、pH 7.4 及び 8.0 の PMBO(F)-HVJ-E 分散液を pH 6.0 とすると PMBO(F)が脱離されることも確認した。溶血試験では、溶液のポリマー濃度が増加することによって溶血が抑制される傾向が確認された。今後、より詳細なポリマー濃度依存性を評価する予定である。

Development of HVJ-E surface modification technique utilizing benzoboroxole-containing polymer

Shuichiro Yoneoka[1], Yasuhiro Nakagawa[2,3], Mitsuhiro Ebara[2,3,4], Takehiko Tsukahara[5]
[1]Tokyo Tech. Sch. of Environment and Society Dep. of Transdisciplinary Sci. and Engineering, [2]NIMS. MANA., [3]Tsukuba Univ. Faculty of Pure and Applied Sci., [4]Tokyo Univ. of Sci. Graduate Sch. of Industrial Sci. and Tech., [5]Tokyo Tech. Institute of Innovative Research. LANE.
Tel, Fax: +81-3-5734-3067, E-mail: ptsuka@lane.iir.titech.ac.jp

2P-038

血清アルブミン認識空間を有する分子インプリントナノゲルの生細胞取り込み挙動

[1] 神戸大学大学院工学研究科
○早川　なつき [1]，山田　託也 [1]，北山　雄己哉 [1]，竹内　俊文 [1]

【緒言】
ナノ粒子は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) や in vivo イメージングなど生体への応用が期待される機能性材料であり、生細胞に対するナノ粒子の相互作用解析は、ナノ粒子の生体応用において重要な知見である。我々はこれまでに、投与されたナノ材料が生体内において非オプソニンタンパク質であるアルブミンを認識し、後天的にステルス性を獲得する新しいナノキャリアとして分子インプリントポリマーナノゲル (MIP-NGs) を開発し、高い血中滞留性を示すことを明らかにし、また、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果に基づいて、腫瘍組織に蓄積することも明らかにした [1)]。本研究ではこれまでに DDS キャリアとして開発を進めてきた MIP-NGs の生細胞に対する取り込み挙動の解析を試みた。

【実験】
N-Isopropylacrylamide, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, *N,N′*-methylenebisacrylamide, fluorescein acrylamide, pyrrolidyl acrylate を混合し、human serum albumin (HSA) を標的タンパク質、V-50 を開始剤、10 mM phosphate buffered saline (pH7.4) を溶媒として用い無乳化剤沈殿重合によって MIP-NGs を作製した。得られた MIP-NGs はサイズ排除カラムクロマトグラフィおよび限外ろ過を用いて精製した。胃がん細胞株 FU97 を培養し、まず MIP-NGs の細胞毒性を検討した。5% CO_2 インキュベーター (37°C) 内で 24 時間培養した FU97 に MIP-NGs を添加し、24 時間後に生存率の測定を行った。播種した FU97 に MIP-NGs を 25 μg/mL になるように加え、24 時間静置した後、各種トラッキング試薬を添加し細胞小器官を染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) で得られた画像から共局在係数を算出することで、細胞中における MIP-NGs の局在箇所を解析した。さらに、播種した FU97 を無血清培地で洗浄し、各種阻害剤とともに MIP-NGs を添加し 3 時間静置した後、CLSM で観察することで、取り込み機構解析を行った。最後に HSA の MIP-NGs の細胞内取り込みへの影響について検討した。MIP-NGs と HSA を 37°C で 1 時間インキュベートした後、無血清培地で洗浄した FU97 に様々な濃度の HSA と共に添加し 3 時間静置した。フローサイトメトリーにて蛍光強度を測定し、各条件での MIP-NGs の細胞内取り込みを比較した。

【結果と考察】
MIP-NGs の FU97 に対する細胞毒性試験を行ったところ、粒子濃度 174 μg/mL でも生存率がほぼ 100%となり、細胞毒性が低いことが示された。MIP-NGs を FU97 に添加し、リソソームおよびミトコンドリア染色試薬と同時染色すると、リソソーム染色試薬と高い共局在係数を示すことから、リソソームに局在することがわかった。また細胞機能が停止しエンドサイトーシスが起こらない 4°C において MIP-NGs を添加したところ、細胞内蛍光が観察されなかったことから、粒子が細胞に取り込まれる機構はエンドサイトーシスであることが示された。さらにエンドサイトーシス阻害剤を添加して、MIP-NGs の取り込み挙動を観察したところ、MIP-NGs の主な細胞取り込み機構は、カベオラ・脂質ラフト媒介エンドサイトーシスであることが確認された。また、HSA の存在下で MIP-NGs を添加すると HSA 濃度が高くなるにつれて MIP-NGs の細胞内蛍光強度が減少することが明らかになり、HSA 濃度に依存して MIP-NGs の細胞取り込み量が変化することを明らかにした。

【参考文献】
(1) Takeuchi, T. et al. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** **56**, 7088-7092 (2017)

Cellar uptake of albumin-imprinted nanogels into living cells
Natsuki Hayakawa[1], Takuya Yamada[1], Yukiya Kitayama[1], Toshifumi Takeuchi[1]
[1] Graduate School of Engineering, Kobe University
Tel: +81-78-803-6158, Fax: +81-78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

2P-039

EGCG-Modified Nanoparticle for Apoptosis

○Gan Ning[1], Tooru Ooya[1]
[1] Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University

[Introduction]

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, while most available therapeutic methods have formidable disadvantages. Nanoparticles (NPs) have been extensively studied as drug carriers for cancer therapy. Among them, gold NPs (AuNPs) have been widely put a high value, owing to properties such as non-reactive, versatility in surface modification, delivery to cancer cells due to the enhanced permeation and retention (EPR) effect, and easy removal from human body. Epigallocatechin gallate (EGCG), the major component in tea polyphenols, has been reported to possess anti-cancer effects. In addition, EGCG can specifically bind to the 67 kDA laminin receptor that is overexpressed in some cancer cells. However, the high concentration of EGCG was required to induce the cancer cell death. In this study, EGCG-AuNPs with different sizes were prepared to increase the local concentration of EGCG. Their cytotoxicities toward the cultured cancer cells were evaluated to discuss the effect of EGCG-AuNPs.

[Experimental]

EGCG was dissolved in DI water (9 ml) and stirred continuously at continuously at 30°C for 15 min. Then, 1 ml of $HAuCl_4 \cdot H_2O$ solution with different concentration was added dropwise into the EGCG solution under stirring, followed by 2 h stirring at 30°C. Then, the solution was centrifuged for 30 min (20,000 rpm), washed by water and acetate buffer (0.1 M, pH=5), and re-dispersed in the acetate buffer. The samples were sonicated for 1h, and then stored at 4 °C. Amount of EGCG in EGCG-AuNPs was determined by Folin-Ciocalteu reagent (FCR) method. The obtained EGCG-AuNPs were analyzed by UV-vis spectra and dynamic light scattering (DLS).

HeLa and NIH3T3 cells (passage more than 3 times) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) at 37℃ in a humidified 95% air/5% CO_2 incubator. The cell viability in the presence of EGCG-AuNPs was tested by the CCK-8 assay.

[Results and Discussions]

EGCG-AuNPs with different ratio of EGCG and Au were successfully prepared. As the concentration of EGCG increased, the color of EGCG-AuNPs changed from red to blue, while the sizes almost shown no increase before n_{EGCG}:n_{Au} reached 5:1 (70 nm). This means that the size of EGCG-AuNPs could be modulated by the feed ratio. The cell viability of EGCG-AuNPs was compared with EGCG itself. Greater cytotoxicity of EGCG-AuNPs than EGCG at the same concentration against HeLa cells was obtained, suggesting that the increased local concentration of EGCG increased the cytotoxicity. Furthermore, small-sized EGCG-AuNPs exhibited the increased cytotoxicity, suggesting the size-dependent cytotoxicity. The cytotoxicity study toward NIH3T3 cells was also carried out, and we will report them in this presentation.

EGCG-Modified Nanoparticle for Apoptosis
Gan Ning[1], Tooru Ooya[1]
[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

2P-040

薬物徐放・組織接着材料への応用を目指した tetraPEG–高分子ミセル複合化ゲル

[1] 東京農工大学大学院工学府応用化学専攻
○小川　雅人[1]，村上　義彦[1]

【緒言】
薬物の効果を最大限に発現するためには、薬物の血中濃度を所望の濃度に保つ必要がある。また、近年、止血材、癒着防止材、薬物徐放デバイスなどへ応用可能な材料として、生体組織に接着する材料（組織接着材料）が注目されており、現在までにさまざまな組織接着材料が開発されている。しかし、現状では、生体適合性、安全性、薬物徐放性を全て満たす組織接着材料の報告例は少ない。そこで、本研究では、生体適合性が高く均一な網目構造を有する tetraPEG ゲルに薬物の内包・徐放機能を有する表面アルデヒド化高分子ミセルを組み込んだ、tetraPEG-高分子ミセル複合化ゲルの開発を検討した。

【実験】
モデル薬物として蛍光物質であるローダミン B（RhB）を内包した、ポリエチレングリコール（PEG）-*b*-ポリ乳酸（PLA）ブロック共重合体（分子量 PEG2800-PLA2900, PEG3490-PLA6260）が形成する表面アルデヒド化高分子ミセルを調製した（濃度 : 0.03 mM）。Carmody 広域緩衝液（pH 8）に溶解した末端に *N*-ヒドロキシスクシンイミド基を有する tetraPEG（tetraPEG-NHS, 分子量 20,000, 40,000, 濃度 2.5 mM）を RhB 内包高分子ミセル水溶液と混合した。この混合溶液と、あらかじめ Carmody 広域緩衝液（pH 8）に溶解した末端にアミノ基を有する tetraPEG（tetraPEG-NH_2, 分子量 20,000, 40,000, 濃度 2.5 mM）を混合し、ゲルを調製した。tetraPEG-NH_2 水溶液、tetraPEG-NHS 水溶液、ミセル水溶液の体積比率は 2:1:1 とした。調製したゲルを透析膜に入れ、サンプル瓶内において 40 mL のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して透析した（温度 37℃, 透析時間 48 時間）。透析膜外の PBS を一定時間ごとに採取し、分光蛍光光度計を用いて RhB の放出量を求め、RhB の放出挙動を評価した。

【結果と考察】
tetraPEG の分子量の増加にともない、RhB の放出速度が低下した（Fig. 1）。また、tetraPEG の分子量が 20,000 の場合、ミセルを形成するブロック共重合体の PLA の分子量の増加にともない、RhB の放出速度が低下した。以上より、tetraPEG およびミセルを形成するブロック共重合体の分子量を変化させることにより、薬物の放出速度を調節可能であることが示唆された。

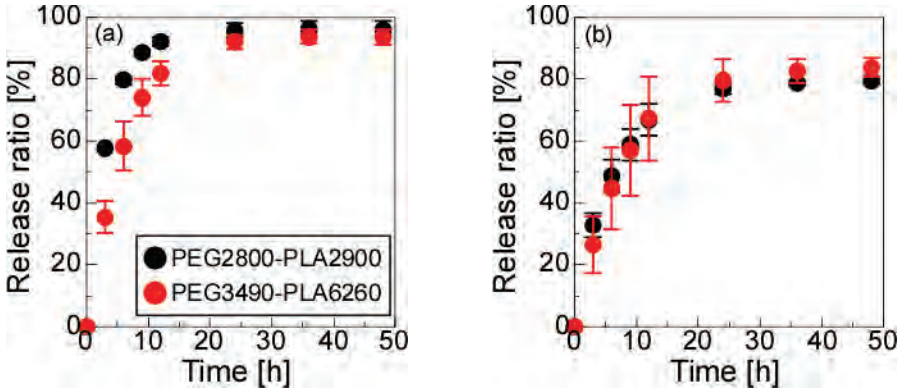


Fig. 1 Release behavior of RhB in tetraPEG-polymeric micelle hybrid gels
(The molecular weights of tetraPEG were (a) 20,000 and (b) 40,000)

Tissue-adhesive tetraPEG-polymeric micelle hybrid gel for sustained drug release

Masato Ogawa[1], Yoshihiko Murakami[1]
[1]Department of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology
Tel: +81-42-388-7387, Fax: +81-42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

2P-041

経肺投与 DDS への応用を目指した新奇な多孔質 PLGA 粒子 ～薬物放出特性の評価～

[1] 東京農工大学　工学府　応用化学専攻
○髙橋　勉[1]，村上　義彦[1]

【緒言】

経肺投与法は薬物を吸入することで肺へ薬物を送達する手法であり、特異な構造を有する肺胞を利用するため薬物の吸収効率が高く、痛みをともなわない、等の利点から、新たな投薬方法としての発展が期待されている。経肺投与に適した薬物キャリアは、適切な粒子径（1～3 μm）を有し、粒子密度が低く、粒子表面の分子修飾が容易である、等の条件を満たす必要がある。しかし、これらの条件を全て満たす粒子の調製は困難であった。このような背景から、本研究室では、経肺投与 DDS への応用を目指して表面修飾マイクロ粒子の開発を検討してきた。その開発過程において、疎水性高分子（粒子形成剤）および両親媒性ブロック共重合体（界面活性剤）を溶解した有機溶媒と水を一段階のみ機械乳化し、液中乾燥することによって、多孔質粒子が偶然得られた[(1)]。この多孔質粒子は前述の条件を満たすため、経肺投与用の薬物キャリアとして応用できる可能性が高い。本研究では、多孔質粒子にイミダゾール系抗真菌薬であるルリコナゾール（LLC）を内包し、両親媒性ブロック共重合体および粒子形成剤の組成や分子量が LLC 内包粒子の物性や薬物放出挙動に及ぼす影響を評価し、粒子からの薬物放出特性を制御することを検討した。

【実験】

両親媒性ブロック共重合体として末端メトキシ化ポリエチレングリコール-*b*-ポリ乳酸（mPEG-PLA）を合成した。粒子形成剤として PLGA（ポリ乳酸－グリコール酸共重合体）または PLA、界面活性剤として mPEG-PLA または Tween85、疎水性薬物として LLC を用いて粒子を調製した。液中乾燥した後、遠心分離、純水洗浄、凍結乾燥を経て回収した粒子について、粒子の表面形態や空孔径、粒子径、内包率を評価した。界面活性剤の組成や種類、粒子形成剤の組成や分子量が粒子の物性に及ぼす影響を評価し、PBS 中における粒子の表面形態の経時変化を観察するとともに薬物放出挙動を評価した。

【結果と考察】

界面活性剤として mPEG8700-PLA7500（4 桁の数字は数平均分子量を表す）を用いた系では多孔質粒子が得られ、粒子形成剤の種類に依存せず同程度の空孔径、内包率を示した。一方、Tween85 を用いた系では無空孔粒子が得られ、内包率は多孔質粒子と同程度の値を示した。多孔質粒子は比表面積が大きいため、粒子形成剤の種類に依存せず PBS に分散して数時間で粒子表面の溶解が見られ、迅速な薬物放出を示した。無空孔粒子は収率が多孔質粒子の 1/4 程度と低く、形状を維持した粒子が 24 時間経過後でも観察されたが、経時変化にともない凹みを有する、または潰れた粒子が多くなった。また、多孔質粒子と比較して比表面積が小さいため、初期バースト放出が抑えられた。本多孔質粒子は吸引試験において高い肺送達能を示しており、制御可能な薬物放出機能を付与することによって、経肺投与による治療が期待される様々な病気に対して応用できる可能性がある。

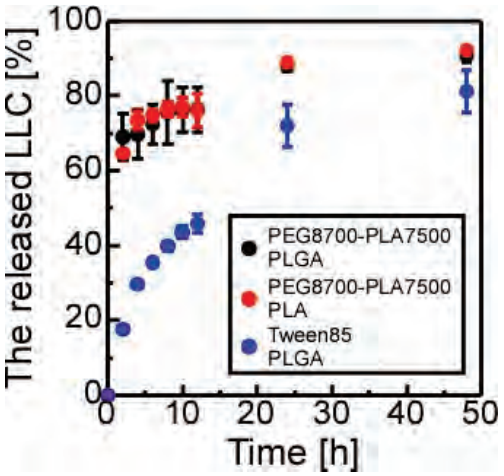


Fig. 1 The effect of surfactants and particle forming agents on the release of LLC from the particles

(1) Takami, T., Murakami, Y., *Langmuir*, 30, 3329-3336 (2014)

Development of novel porous particles for pulmonary DDS –evaluation of drug release-

Tsutomu TAKAHASHI[1], Yoshihiko MURAKAMI[1]
[1]Development of Organic and Polymer Materials Chemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology
Tel/Fax: +81- 42-388-7387, E-mail: muray@cc.tuat.ac.jp

2P-042

抗がん剤含有高分子ナノ粒子–血小板ハイブリッド DDS のデザイン

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
○城　潤一郎，明石　祐典，田畑　泰彦

【緒言】
血小板は、体内の異常部位へ集積し、刺激に対して適切な生理活性物質を分泌することで生体の恒常性を保っている。この血小板をドラッグキャリアとして用いることができれば、血小板のもつ異常部位集積能力を活用したドラッグデリバリーが可能となるであろう。そこで本研究では、血小板とドラッグを組み合わせた DDS（血小板ハイブリッド DDS）の構築を目指した。血小板ハイブリッド DDS の構築には、血小板を凝集させずにドラッグと血小板を混合する技術、方法論の開発が必要である。本研究では、難水溶性抗がん剤を内包した乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）ナノ粒子を調製、それを血小板と混合した。混合時での血小板凝集に与える PLGA ナノ粒子の物理化学的性質の影響を調べるとともに、抗がん剤内包 PLGA ナノ粒子との混合で調製した血小板ハイブリッドの抗がん活性を調べた。

【実験】
PLGA（乳酸：グリコール酸＝50：50、重量平均分子量：20,000）をアセトンに溶解させ、一方、抗がん剤のパクリタキセル（PAC）をエタノールに溶解させた。この 2 つの溶液の混合した後、種々の界面活性高分子を含む水溶液中へ滴下し乳化させた。用いた界面活性高分子は、ポリビニルアルコール（PVA,　鹸化度　86-90%，重合度　1,000、日本酢ビ・ポバール株式会社から供与）、ゼラチン（重量平均分子量：10,000、等電点 5.0（Gel5）あるいは 9.0（Gel9）、新田ゼラチン株式会社から供与）、あるいはスペルミン導入ゼラチン（スペルミン導入率：1（Spe-Gel1）、2（Spe-Gel2）、および 4%（mole/mole）（Spe-Gel4））である。それぞれの乳化液を撹拌しながら有機溶媒を蒸発させ、PAC を内包した PLGA ナノ粒子（PAC-PLGA ナノ粒子）を得た。PLGA および PAC 濃度、界面活性高分子の種類、ならびに撹拌速度を変化させることにより、異なる PAC-PLGA ナノ粒子を作製した。次に、常法にて C57BL/6 マウス（15 週令、オス）より血小板を単離、タイロード緩衝液中に懸濁させた。この血小板懸濁液と PLGA ナノ粒子のリン酸緩衝生理食塩水の懸濁液とを 37℃で混合した。混合液の濁度の時間変化から血小板の凝集挙動を調べた。また、PAC-PLGA ナノ粒子と 37℃、2 時間混合した後の血小板中の PAC 量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。加えて、PAC を含む血小板ハイブリッドをがん細胞とともに培養し、がん細胞の増殖挙動を評価した。

【結果と考察】
Spe-Gel を用いて作製した正電荷表面をもつ PLGA ナノ粒子は、血小板を凝集させたが、Gel5、Gel9、および PVA で作製した負電荷表面をもつ PLGA ナノ粒子では、血小板は凝集しなかった。これは、PLGA ナノ粒子の正電荷が負電荷表面をもつ血小板と強く相互作用したため、凝集の程度が高まったと考えられる。凝集が見られなかった PAC-PLGA 粒子と血小板との混合物には、PAC が含まれていた。PAC を含む血小板ハイブリッドは、PAC-PLGA 粒子と比較してがん細胞の増殖を有意に阻害した。これは、PAC-PLGA ナノ粒子が血小板とハイブリットされることによって、がん細胞へより多く取り込まれ、細胞内で PAC を放出することによって、増殖抑制に寄与したためと考えられる。

Design of drug loaded polymer nanospheres-platelet hybrid DDS

Jun-ichiro Jo, Yusuke Akashi, Yasuhiko Tabata
Laboratory of Biomaterials, Department of Regeneration Science and Engineering, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University
Tel: +81-75-751-4108, Fax: +81-75-751-4646, E-mail: jo@infront.kyoto-u.ac.jp

2P-043

脂肪酸修飾 SN-38 位置異性体のナノ・プロドラッグの作製と薬効評価

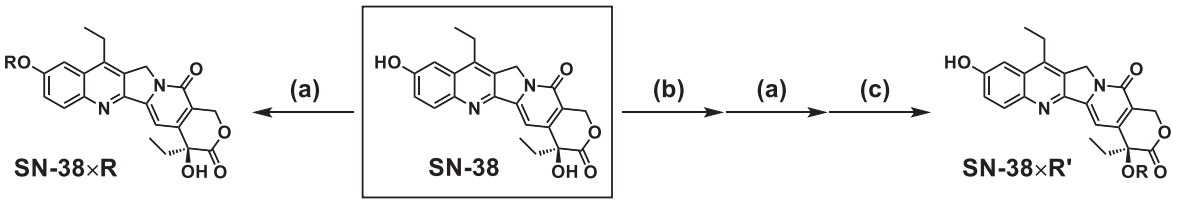
東北大学　多元物質科学研究所

○谷田　恵太，小関　良卓，笠井　均

【緒言】近年、ドラッグデリバリーの分野では高分子などから構成されるキャリアに薬物を内包させる手法が報告されているが、キャリア自身による副作用や製造面での問題が指摘されている。我々はキャリアが抱える問題を改善する手法として、キャリアを使用せずに薬物をナノ粒子化した「ナノ・プロドラッグ」を提唱した。これまでに抗がん活性化合物である SN-38 のフェノール性水酸基に対して様々な置換基を導入したプロドラッグ（SN-38×R）を合成し、再沈法 [1]に供することでナノ・プロドラッグを作製することに成功している [2]。そこで本研究では、SN-38 が有するもう一つの水酸基すなわち三級水酸基に着目し、モデルとしてミリスチン酸によるプロドラッグ化を施した SN-38 位置異性体の合成について検討した。発表では、作製したナノ・プロドラッグの物理化学的特性、薬理活性の結果を報告する。また、合成した位置異性体を任意の割合で混合し、再沈法にて共沈を行うことで作製したナノ・プロドラッグついても併せて報告する。

【実験】脱水縮合によりミリスチン酸を導入した SN-38×C_{14} (yield: 65%, 1 step)を、3 行程の反応により SN-38×C_{14}'（yield: 56%, 3 steps）をそれぞれ合成した（Scheme 1）。得られたプロドラッグの THF 溶液 100 μL を激しく攪拌した水 10 mL 中に注入することで 0.1 mM のナノ・プロドラッグ分散液を作製した。作製したナノ・プロドラッグの粒径・形状を走査型電子顕微鏡で観察し、粒径の経時変化を評価するため動的光散乱法により粒径を測定した。次いで、ナノ・プロドラッグの血中での加水分解性を評価するため、マウス血清中における加水分解耐性を評価した。さらに 0.04–10 μM のナノ・プロドラッグの分散液を、HepG2 細胞 (ヒト肝がん由来)を培養したプレートに添加し、48 時間後の *in vitro* 抗がん細胞活性を WST-8 アッセイにより評価した。

【結果と考察】作製したナノ・プロドラッグを走査型電子顕微鏡により観察したところ、それぞれ粒径が 200　nm 程度の球状粒子であった。マウス血清を用いた加水分解性の評価においては、SN-38×C_{14} と比較して SN-38×C_{14}' が極めて高い加水分解耐性を示した。さらに、HepG2 細胞を用いて *in vitro* 抗がん細胞活性を評価したところ、加水分解が容易であり活性体を放出しやすい SN-38×C_{14} が SN-38×C_{14}' と比較して高い薬理活性を示した。また、再沈法で作製する位置異性体の混合ナノ・プロドラッグは混合の割合を変えることで、加水分解性や抗がん細胞活性を任意に変えることができることが明らかになった。



Scheme 1. Synthesis of fatty acid-modified SN-38 regioisomer (R=Myristic acid)
(a) RCOOH, EDC, DMAP, CH_2Cl_2; (b) $(Boc)_2O$, Pyridine, CH_2Cl_2; (c) TFA, CH_2Cl_2

1) H. Kasai *et al*., *Jpn*. *J*. *Appl*. *Phys*. **31**, L1132–L1134 (1992).
2) Y. Koseki *et al*., *Bull*. *Chem*. *Soc*. *Jpn*. **89**, 540–545 (2016).

Nano-prodrugs of SN-38 regioisomers: Their Development and physicochemical properties

Keita Tanita, Yoshitaka Koseki, Hitoshi Kasai
Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University
Tel: +81-22-217-5587, Fax: +81-22-217-5614, E-mail: keita.tanita.p6@dc.tohoku.ac.jp

2P-044

がん細胞選択的な治療を可能にするペプチド担持型ポリマーの開発

[1] 九州大学大学院システム生命科学専攻，[2] 九大未来センター，[3] 九大分子システムセンター，[4] 九大先端医療イノベーションセンター
○秀野　智大[1]，杉野　竜成[1]，遠山　聖子[1]，松本　蛍[1]，中村　雄太[1]，森　健[1,2]，岸村　顕広[1,2,3]，片山 佳樹[1,2,3,4]

【緒言】難治性疾患であるがんの治療法の一つとして、細胞のアポトーシスを誘導する自殺遺伝子を用いる遺伝子治療は以前から存在する。しかし、がん細胞だけでなく、正常細胞でも遺伝子発現が起きてしまい、重篤な副作用を引き起こす問題点が残されており、正常細胞での厳密な遺伝子発現の抑制を実現できるキャリアの開発が望まれている。そこで我々は、種々のがん細胞で異常亢進が認められるプロテインキナーゼ Cα (PKCα) に応答して、遺伝子発現するキャリアを開発してきた。PKCα は基質ペプチドをリン酸化する働きがあるため、PKCα 基質ペプチド担持型ポリマーを用いて、リン酸化に応答して遺伝子発現させることを試みた。しかし、これまで開発したキャリアは、腫瘍内投与では効果を示すものの、血中投与ができないという問題点があった。そこで、本研究では、高い血中安定性を有するポリエチレングリコール (PEG) と、低細胞毒性かつ高い遺伝子発現能を有するポリマーであるトリエチレンテトラミン修飾したポリアスパラギン酸 PAsp(TET) からなるブロックポリマーをベースとし、これに PKCα 応答性を付与することを目的とした。

【実験】定法に従い、TET の導入率が 60mol% の PEG-PAsp(TET) を得た。これに PKCα の基質となるペプチドを修飾した PEG(S) と、ネガティブコントロールとして 基質配列の Ser を Ala 置換したものを修飾した PEG(A) を合成した。これらのポリマーとプラスミド DNA (pDNA) で複合体を形成させ、ヒト脳腫瘍細胞株 U-87MG 細胞における遺伝子発現能を評価した。

【結果と考察】^{1}H-NMR より、PEG(S), PEG(A) のペプチド導入率を 7.2mol%, 6.2mol% と決定した。これらのポリマーは、pDNA (ルシフェラーゼ遺伝子をコード) と約 120 nm の複合体を形成した。また、複合体にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を添加し、24 時間放置しても粒子径が変化しないことから高い塩安定性を確認した。複合体の遺伝子発現実験の結果は、期待したようなPEG(A) における遺伝子発現の抑制は見られず、PEG(S) と同程度の遺伝子発現を示した。そこで、私はペプチド修飾率を増加させ、pDNA と基質ペプチドの相互作用をより促進させることを試みた。PEG(S), PEG(A) のペプチド修飾率が 12.4mol%, 10.1mol% であるポリマーを合成し、同様の遺伝子発現実験を行った。その結果、PEG(S) の遺伝子発現量が PEG(A) に比べ、約 9.4 倍高く出ていることを確認することができた (図 1)。今後の方針としては、ペプチド修飾率の最適化を行った後、動物実験を行うことで、本遺伝子キャリアの生体内での治療効果を確認しようと考えている。

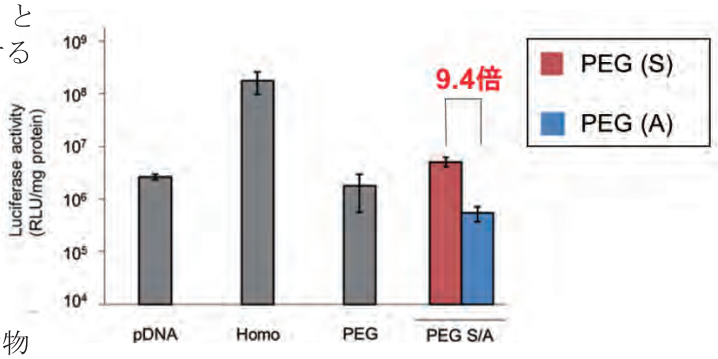


図 1. ペプチド修飾率を増加させたポリマーによる遺伝子発現効率の実験

Development of peptide modificated polymer that enables selective treatment of cancer cells

Tomohiro Shuno[1], Ryusei Sugino[1], Shoko Toyama [1], Hotaru Matsumoto[1], Yuta Nakamura[1], Takeshi Mori[1,2], Akihiro Kishimura[1,2,3], Yoshiki Katayama[1,2,3,4]
[1] Graduate school of engineering, Kyushu University, [2] Center for Future Chemistry, [3] Center for Molecular Systems, [4] Center for Advanced Medical Innovation
Tel: +81-92-802-2850, Fax: +81-92-802-2850, E-mail: 3SL17011W@s.kyushu-.ac.jp

2P-045

PMEA 系ランダム共重合体による界面構造制御と生体親和性への影響

[1] 九州大学大学院工学府，[2] 九州大学先導物質化学研究所，[3] 山形大学有機材料システム研究推進本部
○瀬上　裕斗[1]，上田　智也[1]，村上　大樹[1,2]，田中　賢[1,2,3]

【緒言】使用の際に生体成分との接触を伴う材料には異物反応を引き起こさない生体親和性が必須となる。特に血液と接触する人工臓器や人工血管には抗血栓性が求められる。当研究室では材料と生体成分との界面に形成される水和層、特に高分子鎖と中程度に相互作用する「中間水」に着目し、タンパク質吸着や細胞接着の制御において中間水が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた [1)]。また最近では、含水時に中間水が形成され、血球細胞は接着せずに正常細胞やがん細胞は接着する poly(2-methoxyethyl acrylate)(PMEA)がリン酸緩衝生理食塩水（PBS）界面で数十ナノメートルスケールの微細構造を自発的に形成することを報告した [2)]。微細構造の凸部にフィブリノーゲンが選択的に吸着することも確認されており、この微細構造が生体親和性に影響していると考えられる。本研究では、PMEA と化学構造と物性が類似しているが、微細構造およびタンパク質吸着や細胞接着が大きく異なる poly(butyl acrylate) (PBA)に着目し、これらのランダム共重合体の組成により微細構造を制御し、生体親和性への影響を明らかにすることを目的とした。

【実験】2-methoxyethyl acrylate (MEA)と butyl acrylate (BA)を共重合することで MEA の mol%比がそれぞれ 78,47,25 のランダム共重合体 P(MEA-*random*-BA)(PMBX;X = 78,47,25)を合成した（Fig. 1）。合成した PMBX および PMEA・PBA の 0.2 wt/vol%溶液を組織培養ポリスチレン上にキャストして作製した高分子膜上でフィブリノーゲンの吸着量とγ鎖露出度を評価した。また、ポリエチレンテレフタラート上に作製したスピンコート膜を用い、PBS 中での微細構造やフィブリノーゲン吸着挙動の AFM 観察を行った。

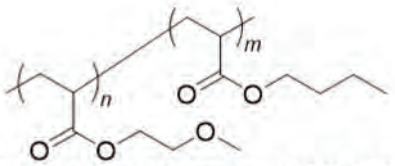


Fig. 1 Chemical structure of PMBX

【結果と考察】各高分子膜上のフィブリノーゲンの吸着量は PMEA では吸着が抑制され、PBA では多量に吸着したことが確認された。PMBX では吸着量は MEA 共重合比の減少に伴い PMEA と PBA の間で単調に増加していたが、フィブリノーゲンのγ鎖露出度は PMB47 から急激に増加することが確認された。また、AFM 観察結果からは、MEA 共重合比の減少に伴い微細構造の凸部のサイズが次第に大きくなっていることが分かった (Fig. 2)。さらにフィブリノーゲンを吸着させての AFM 観察では、微細構造サイズの増大と共に、PMB47 から凹部でのフィブリノーゲンの吸着が促進されている様子も観察された。微細構造のサイズや組成がフィブリノーゲンの吸着・変性挙動に密接に関係していることが示唆される。発表ではさらに血小板や接着細胞の AFM 観察の結果も合わせて、微細構造と生体親和性との関係について議論する予定である。

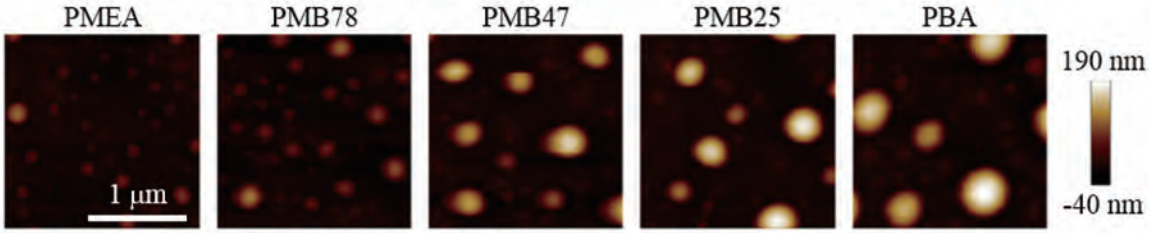


Fig. 2 AFM topographic images of each polymer/PBS interfaces.

【参考文献】

1) M. Tanaka, *et al.*, *Polym. J.*, **2013**, *45*, 701-710.
2) D. Murakami, *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2016**, *2*, 2122-2126.

Control of Interfacial Structures and Biocompatibility by PMEA Based Random Copolymers

Yuto SEGAMI[1], Tomoya UEDA[1], Daiki MURAKAMI[1,2] and Masaru TANAKA[1,2,3]
[1]Graduate School of Engineering, Kyushu University [2]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, [3]Institute of Organic Engineering, Yamagata University
Tel: 092-802-6238, Fax: 092-802-6238, E-mail: masaru_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

2P-046

Novel Biocompatible Polysaccharide-based Self-healing Slide-ring Hydrogel

[1] Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University, Kobe, Japan
○Ik Sung Cho[1], Tooru Ooya [1]

【Introduction】

Hydrogels with remarkable mechanical properties have been investigated by using the slide-ring (SR) gel, which contains topologically interlocked noncovalent cross-links that can slide along a threaded polymer backbone. So far, many slide-ring hydrogels have been successfully investigated. However, most of the slide-ring hydrogels are prepared by using the toxic initiators or the chemical agents, which often causes uncontrollable gelation processes and limited *in vivo* applications. In this study, we report the preparation of slide-ring gels in mild condition without using any toxic chemical regents, demonstrating soft and good mechanical properties and fast-efficient self-healing behavior using a simple one-pot method.

【Experimental】

Hydroxypropylated aldehyde-polyrotaxane (HP-PRX-ALD, **Fig. 1**) solution with concentration of 5, 7.5, 10 wt % in distilled water. These were mixed with an aqueous glycol chitosan (GC) solution of 3 wt %. The mixtures were stirred by using vortex for 10 s. The gelation time of the HP-PRX-ALD were observed by the tube inverting method. The mechanical properties of the HP-PRX-ALD/GC gels were studied by a universal material testing machine. Cylindrical HP-PRX-ALD/GC gels were constructed (**Fig. 1**). All hydrogels were subjected to a constant compression speed of 1 mm min^{-1}. The self-healing properties of the HP-PRX-ALD/GC gels were performed using rheometer.

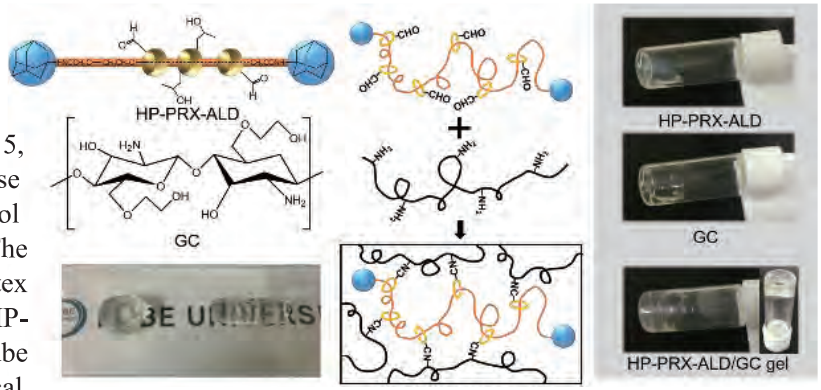


Fig. 1. Schematic illustration of GC/HP/ALD-PRX hydrogels.

【Results and Discussions】

The obtained hydrogels are flexible and durable when compressed. Thus, the mechanical properties of these hydrogels are completely different from those of all existing chemical hydrogels. The stress-strain curves displayed that all gels exhibited not only high strength but also over 90 %. The hydrogels did not have a fracture point during the compression process, indicating their non-fragile nature. The hydrogels remained in their original condition without any damage on the surface after 10 loading-unloading cycles. Moreover, the stretching length of hydrogels could reach 630 %, which also displayed fairish elasticity. These results were attributed to the mobile motion of α-CD molecules along the PRX main chain, and the pulley effect might occur. The prepared HP-PRX-ALD/GC hydrogels are not only flexible and durable, but also exhibit self-healing properties at ambient temperature: For example, the original rod-shaped HP-PRX-ALD/GC hydrogel samples were cut into four pieces. Then, the freshly fractured surfaces of the four pieces of the hydrogels were brought into contact, merging to form a single, rod-shaped hydrogel sample. After 30 min, the cut hydrogels became a single hydrogel. The GC/HP/ALD-PRX hydrogels with both outstanding mechanical properties and biocompatibility hold promise for potential use as biomedical materials.

Novel Biocompatible Polysaccharide-based Self-healing Slide-ring Hydrogel
Ik Sung Cho[1], Tooru Ooya [1]
[1] Department of Chemical Science and Engineering, Kobe University, Kobe, Japan
Tel: +81-78-803-6255, Fax: +81-78-803-6255, E-mail: ooya@tiger.kobe-u.ac.jp

2P-047

組織工学用ペプチドハイドロゲルの機械的特性の向上

[1]関西大　化学生命工，[2]大阪医科大学，[3]関西大 ORDIST
○青山　丈[1]，大槻　周平[2]，奥野　修大[2]，根尾　昌志[2]，柿木　佐知朗[1,3]，平野　義明[1,3]

【緒言】組織工学の分野では、細胞、成長因子そして足場の 3 つの要素により組織の再生が可能である(1)。その 3 つの要素に含まれる足場には生分解性、細胞接着性、3 次元構造体の形成が求められる。足場に求められるこれらの条件を考慮し、ペプチドハイドロゲルを選択した。しかし、ペプチドハイドロゲルは力学的強度の面から限られた場合でしか用いることが出来ない。そこで本研究では、ペプチドハイドロゲルの特性を維持したまま力学的強度を向上させる方法を検討した。

リシン(K)、イソロイシン(I)の繰り返し配列に細胞接着性配列である Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS)を組み込んだ IKIKIKIKIKIKRGDSKIKIKIKIKI(KI24RGDS)を本研究で用いた(2)。KI24RGDS は、親水性表面と疎水性表面を併せ持ち、塩を添加することで疎水性相互作用により自己組織化し、その際、水を内包するためハイドロゲルを形成する。この KI24RGDS の力学的強度の向上のため、塩濃度の検討、β-ストランド領域の添加による力学的強度の変化について報告する。

【実験】Fmoc 固相合成法で KI24RGDS 合成し、高速液体クロマトグラフィーを用いて精製を行った。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)で目的物を同定した。赤外分光法(FT-IR)と円二色性(CD)スペクトル測定により KI24RGDS の二次構造を解析した。イーグル MEM 培地(EMEM 培地)、NaCl 水溶液、リン酸生理食塩水(PBS)の濃度を調整し、KI24RGDS 溶液と混合することでハイドロゲルを形成した。また、KI24RGDS の β-ストランド領域を KI24RGDS 溶液に添加することハイドロゲルを形成した。レオメーターを用いて作成したペプチドハイドロゲルの力学的強度の向上をレオロジー測定にて評価した。

【結果と考察】MALDI-TOF-MS から目的物由来の分子イオンピークが検出されたため、KI24RGDS の合成できたと判断した。CD スペクトル解析から KI24RGDS は 195 nm~205 nm で負のコットン効果が得られたため、ランダムコイル構造を形成したことが確認された。これはリシン残基間の静電的反発が原因だと考えられる。塩添加系で KI24RGDS を測定するとランダムコイル構造から β-シート構造へ転移することが明らかになった。FT-IR スペクトル解析から、KI24RGDS が β-シート構造をとることを分かった。EMEM 培地と KI24RGDS を混合させたところ、ハイドロゲルを形成した。レオロジー測定の結果から 6% KI24RGDS aq.と EMEM 培地から作成したペプチドハイドロゲルは平均貯蔵弾性率 3000 Pa 程度、平均損失弾性率 500 Pa 程度を示した。次に NaCl 水溶液および PBS を用いてゲル化を試みた。各濃度の NaCl 水溶液と 6% KI24RGDS 水溶液を混合させた場合ではハイドロゲルを形成した。また、レオロジー測定の結果から NaCl 水溶液の濃度を高めるにつれて、依存的にペプチドハイドロゲルの弾性率が増加することが確認できた。また、PBS の濃度によって作成したペプチドハイドロゲルおよび β-ストランド領域の添加し作成したペプチドハイドロゲルのレオロジー測定の結果について報告する。

【参考文献】

(1) R Langer, JP Vacanti., *Science,* **260**, 920-926 (1993).
(2) J. P. Schneider, et. al., *J. AM. CHEM. SOC*, **124**, 15030-15037 (2002).

Improvement of mechanical properties of peptide hydrogel for tissue engineering

Jo AOYAMA[1], Shuhei OTUKI[2], Shudai OKUNO[2], Masashi NEO[2], Sachiro KAKINOKI[1,3] and Yoshiaki HIRANO[1,3] [1] Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering Kansai University, [2] Osaka Medical College, [3] Organization for Research and Development of Innovative Science and Technology, Tel: 06-6368-1121, e-mail: yhirano@kansai-u.ac.jp

2P-048

両親媒性糖鎖ポリマーからなる自己組織化フィルムの構築

京都大学大学院工学研究科
○中村　侑介，西村　智貴，澤田　晋一，佐々木　善浩，秋吉　一成

【緒言】両親媒性ポリマーは、水中で自己組織化する事で多彩な構造体を形成する。我々はこれまで、Maltopentaose-*b*-poly(propylene oxide)(MPO-PPG, Fig. 1)からなるポリマーが、水中で１層の二分子膜からなるポリマーベシクルを形成する事を見出した。[1]このベシクルは、リン脂質リポソームや通常のポリマーベシクルとは異なり、低分子物質に対して高い分子透過性を示す事を見いだしている。この機能を利用して、基質を外部から供給しえる酵素反応場として機能する事、さらに、腫瘍周囲でプロドラッグを活性化し、抗がん剤を産生する事で、優れた抗腫瘍効果をもたらす事を明らかにしている。

本研究では、この両親媒性ポリマーの特性に着目し、新規な物質透過性自己組織化フィルムの構築と機能に関する検討を進めている。本発表ではキャスト法による固定化自己組織化フィルムの作製、その内部構造の構造解析やフィルムの水溶液中での安定性などの物性評価について報告する。

【実験】MPO-PPG の粉末をメタノールに溶解させ、Divinyl Sulfone(DVS)を架橋剤として添加した。この溶液をシリコーンシート上にキャストし、約五日間風乾させることでフィルムを作製した。このフィルムの内部構造を SPring-8 BL40B2 において放射光 X 線小角散乱測定(SAXS)により調べた。また、作製したフィルムを一晩 PBS 中に浸漬させることにより耐水性を調べた。

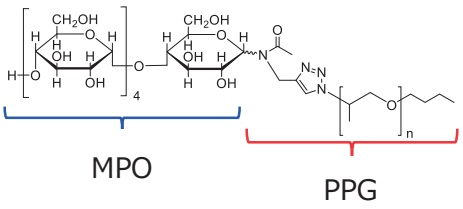


Fig.1 Chemical structure of MPO-PPG

【結果と考察】上記の手法により透明かつ、フリースタンディングなフィルムが得られた。Fig.2 に得られたフィルムの放射光 X 線小角散乱測定の結果を示す。図中の黒い点は六方晶構造を示しており、赤い点はラメラ構造を示している。7 枚のフィルムで測定した結果、すべてのフィルムで同様の結果を示したため、MPO-PPG フィルムは六方晶とラメラのハイブリッド構造をとることが明らかとなった。

次に、フィルムを PBS 中に浸漬した所、浸漬する前ではフィルムは透明であった。浸漬後では白濁していたものの、フィルムの形状は保っていたため一定の耐水性があることが確認された。

さらに、水和したフィルムを氷水で冷却すると、小さな断片へと崩壊した。これは PPG が疎水性から親水性に変化し、疎水化相互作用が失われてフィルムの形状を保てなくなったためであると考えられ、温度応答性の効果が確認された。

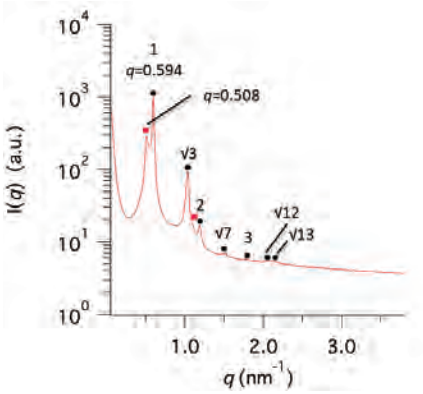


Fig.2 The SAXS profile of MPO-PPG film

【参考文献】1. T. Nishimura, Y. Sasaki, K. Akiyoshi,. *Adv. Mater.*, 2017, 29, 36, 1702406

Preparation of self-assembled film composed of amphiphilic carbohydrate polymers

Yusuke NAKAMURA, Tomoki NISHIMURA, Shin-ichi SAWADA, Yoshihiro SASAKI, and Kazunari AKIYOSHI
Graduate School of Engineering, Kyoto University
Tel: +81-75-383-2589, Fax: +81-75-383-2590, E-mail: nakamura.yusuke.82w@st.kyoto-u.ac.jp

2P-049

蛍光標識法を利用した放射線架橋タンパク質ゲルの架橋構造解明

[1]群馬大学大学院，[2]量子科学技術研究開発機構
○吉田　郁也[1]，木村　敦[2]，田口　光正[2]

【緒言】
コラーゲンやゼラチン、ペプチドなどのタンパク質は、生体適合性や生分解性の高い有用材料として医学、薬学、および生物学分野に応用されている。放射線改質・加工法は、照射によって生成したラジカルを起点とした架橋反応により、橋かけ助剤等の化学薬品を必要とすることなくタンパク質の改質、ゲル化が可能となる優れた手法である。そのため、近年では、再生医療や診断に応用可能な培養環境でも溶けない架橋ハイドロゲルの開発に利用されている。本研究では、代表的なタンパク質であるゼラチンの分子レベルでの放射線架橋構造を明らかにし、放射線架橋ゲルの優れた物性（耐熱性や保水性、ゲルの形状保持性、細胞接着性等）の発現因子を明らかにすることを目的とした。

【実験】
濃度 10 wt.%のゼラチン水溶液に、室温においてγ線を 60-160 kGy (Gy=J/kg) 照射することで、放射線架橋ゲルを作製した。未照射および放射線架橋ゲルを 110 ℃、24 h で塩酸と反応させ、加水分解し、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole と反応させ蛍光標識し、HPLC により分析した。ゲル中に含まれる各種アミノ酸残基について、標準試薬との比較から定性・定量を行った。また、Phe 水溶液への放射線照射により Phe 二量体を作製し、放射線架橋ゲルの架橋アミノ酸残基の分離・定性を行った。

【結果と考察】
未照射ゼラチンと放射線架橋ゲルに含まれるアミノ酸残基組成を比較した結果、照射によりゼラチン中の各種アミノ酸残基が減少するものの、特に Phe の減少率が大きく、160 kGy において約 27%となった（図１）。これにより、Phe が放射線架橋の原因子物質の一つと推測された。また、Phe 水溶液への放射線照射で得られた Phe 二量体のピークが、放射線架橋ゲルの加水分解のクロマトピークと一致した。さらに、放射線照射で生じる水酸化ラジカルは、Phe などの芳香環に対し大きな反応速度定数を有することから、Phe 残基が放射線架橋ゲルの架橋部位の一つであることがあることが強く示唆された。

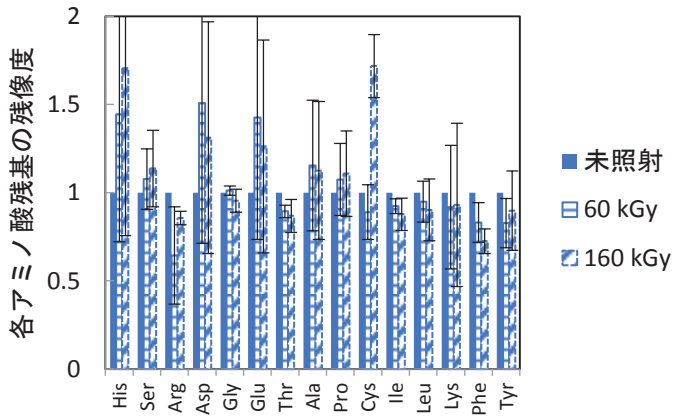


図１　各アミノ酸残基の線量に対しての残存度

以上の結果から、放射線架橋では、Arg-Gly-Asp-配列が損傷されにくいため細胞接着性が保持された足場材料や、Lys のアミノ基や Asp、Glu のカルボキシル基などが消費されにくいことを利用した DDS 薬剤や MRI マーカーを結合させた造影剤などの創出が可能と考えられる。

Structural analysis of radiation crosslinked gelatin using fluorescent labeling method

Fumiya YOSHIDA[1], Atsushi KIMURA[2], Mitsumasa TAGUCHI[2]
[1] Graduate School of Science and Technology Gunma University,
[2] National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology
Tel: 0273469386, Fax:0273469422, E-mail: taguchi.mitsumasa@qst.go.jp

2P-050

足場材料のマイクロ化による新規なボトムアップ組織構築法の創製

[1] 大阪大学大学院　工学研究科，[2]JST-さきがけ
○中　康博[1]，西　宏基[1]，松崎　典弥[1,2]

【緒言】組織工学分野において、三次元組織体の構築が求められている。三次元組織体の構築では、細胞の接着、増殖、細胞外マトリックス (ECM) 産生を促進し、細胞の分化を制御する役割をもつ足場材料の構築が重要である。これまで、足場材料として生分解性の多孔質材料が用いられてきたが、材料内部まで細胞を均一に導入することは、高い気孔率を有する連通孔を持ってしても困難であった。また、ゲルも足場材料として用いられているが、90%以上が水であるため、生体類似の高い ECM 濃度を再現することは難しかった。当研究室では、最近、コラーゲンをマイクロファイバー化した、数百 μm サイズの足場材料を用いることで、生体類似の高濃度コラーゲンを再現可能な新しい組織構築法を報告してきた。本研究では、熱架橋と超音波処理によりおよそ 10 μm のファイバーを作製し、ファイバーの長さの違いが組織構築に影響することを見出したので報告する。

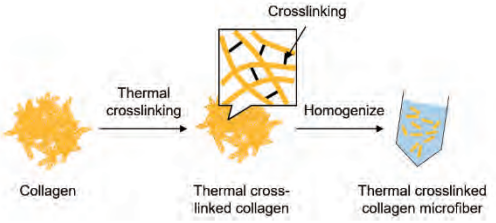


Figure 1. Schematic illustration of preparation of thermally crosslinked collagen microfibers.

【実験】ブタ皮膚由来 I 型コラーゲン（日本ハム（株）より提供）を 200 oC で 24 時間真空乾燥することで熱架橋コラーゲンを得た。熱架橋後の重量を測定することで収率を計算した結果、93%であった。50 mg の熱架橋コラーゲンを 5 mL の超純水中で 6 分間細断することで、熱架橋 CMF（cCMF）を得た。さらに cCMF を超純水中で超音波処理することで、超音波処理 CMF（sCMF）を得た。

【結果と考察】コラーゲンは、熱架橋前後で色や形状に大きな変化はなく、熱変成は起こっていないと考えられる。架橋温度と架橋時間を変えて作製した熱架橋コラーゲンのアミノ基の架橋度を、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）を用いて吸光度測定により算出した。架橋温度が 150℃の場合、24 時間インキュベート後の架橋度はわずか 4%であったが、200℃にすることで架橋度は 12%に大きく増加した。また、架橋時間を 24 時間から 48 時間に増加させると、架橋度は 12%から 16%まで増加した。TNBS と一級アミンが求核置換反応により結合するため、コラーゲン中のリシンやヒドロキシリシンと反応したと考えられる。超純水中で熱架橋コラーゲンを 6 分間細断することで、長さ約 300μm の cCMF が得られた。また cCMF をさらに超音波処理処理することで、長さが約 15μm と cCMF の 20 分の 1 程度になった sCMF が得られた。熱架橋コラーゲンを用いて作製した cCMF と sCMF 分散液の時間経過における透過率の変化を測定した。どちらの CMF も、始めは溶液に均一に分散し、透過率が 10%以下であった。しかし、cCMF は時間に伴い速やかに沈降し、20 分後には透過率 70%以上と高い値を示した。一方、sCMF は 20 分後にも透過率 20%以下と分散状態を維持していた。本手法は、高い水分散安定性を有するコラーゲンファイバーとして応用が期待される。

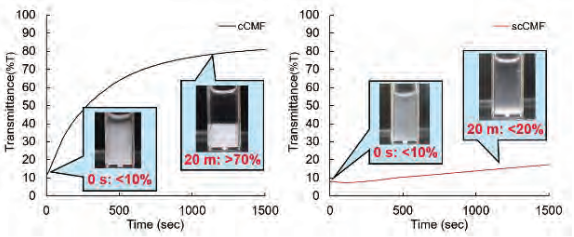


Figure 2. Transmittance of cCMF (left) or sCMF (right) dispersion depending on time.

New bottom up-style organization using the microscaffolding

Yasuhiro Naka[1], Koki Nishi[1], Michiya Matsusaki [1, 2]
[1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University
[2] JST-PRESTO
Tel: +81-6-6879-7357, Fax: +81-6-6879-7359, E-mail: m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

2P-051

異なる脱細胞化方法で調製したECMヒドロゲルの特性評価

[1]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所，[2]大阪工業大学　工学部　生命工学科
○門田　純平[1]，橋本　良秀[1]，藤里　俊哉[2]，木村　剛[1]，岸田　晶夫[1]

【緒言】　生体組織から細胞成分を除去した脱細胞化生体組織は、細胞外マトリクス（ECM）として代替移植材料への応用が検討されている。最近、脱細胞化生体組織を酵素などで可溶化し再構成したECMヒドロゲルが、生体組織の生理活性物質を有しており、抽出コラーゲンなどの単成分ヒドロゲルとは異なる特性を発現する材料として研究されている。脱細胞化処理方法は、界面活性剤による化学的手法が一般的であるが、他にも凍結融解法などの物理的手法も報告されている。我々は、組織損傷が少ない処理方法として高静水圧処理（HHP）法を検討しており、この手法により作製したECMヒドロゲルは、化学的手法に比べて組織構造と生理活性物質が保持されており、組織の再構築に有用ではないかと考えている。本研究では、ブタの膀胱組織(Urinary bladder matrix:UBM)と小腸粘膜下組織(Small intestinal submucosa:SIS)を異なる方法で脱細胞化し、それらのECMヒドロゲルの特性を評価した。

【実験】　ブタ膀胱および小腸を、(1)TritonX-100とデオキシコール酸による界面活性剤法、(2)HHP法（600 MPa）、(3) HHP法（980 MPa）により脱細胞化UBM組織およびSIS組織を調製した。脱細胞化は、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色とDNA残存量によって評価した。脱細胞化生体組織の組成評価のために、ヒドロキシプロリン量および硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG)量を評価した。得られた脱細胞化生体組織は、凍結乾燥して電動ミルで粉末化した。組織粉末にpepsin-HCl溶液（pH 2.0, 1 mg/mL）を添加して可溶化した（室温、48時間）。可溶化後、pHと塩濃度を生理的条件に調整し、37℃で1時間インキュベートしてECMヒドロゲルを作製した。ゲル作製時の濁度変化を測定することで、ゲル化挙動を評価した。作製したECMヒドロゲルは、走査型電子顕微鏡（SEM）観察ならびに圧縮試験によりヒドロゲル構造および機械的特性を評価した。

【結果と考察】　DNA残存量の測定結果より，各処理方法による有意な脱細胞化（DNA残存量< 50 ng/mg dry weight）が確認できた。また、HE染色の観察結果および成分評価より、界面活性剤処理と比較してHHP処理における組織構造や組成への影響が少ないことが確認された。ECMヒドロゲルの比濁度測定によるゲル化挙動を評価した結果、HHP処理組織由来ECMヒドロゲルにおいて、早期のゲル形成が観察された。また、SEM観察および圧縮試験によるゲル構造と機械的特性を評価した結果、UBM、SIS両組織において界面活性剤法で調製した試料よりもHHP法で調製した試料の方が高い弾性率と破断強度を示した。以上の結果より、ECMヒドロゲルは脱細胞化処理方法によって異なる特性を示すことが明らかとなった。

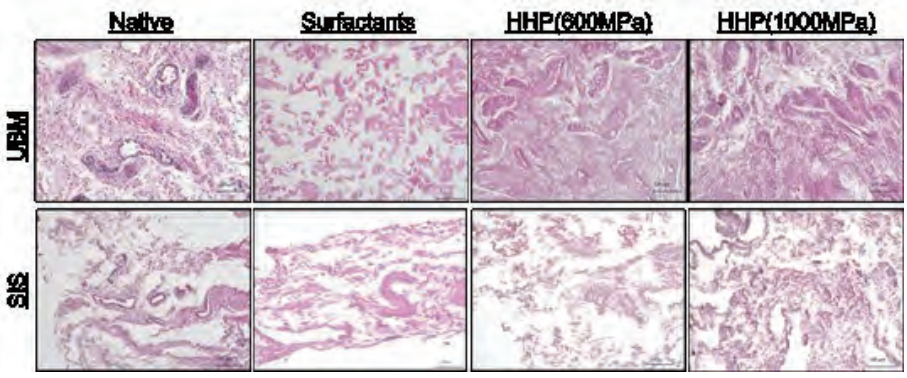


Fig. 1. H-E staining images of decellularized UBM and SIS with various decellularized methods.

Characterization of ECM hydrogels prepared by different decellularization methods

Junpei Kadota[1], Yoshihide Hashimoto[1], Toshiya Fujisato[2], Tsuyoshi Kimura[1], Akio Kishida[1]
[1]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [2]Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology
Tel: +81-3-5280-8110, FAX: +81-3-5280-8005, E-mail: ma170033@tmd.ac.jp

2P-052

細胞を高分子で化学架橋したゲルの開発および細胞種がゲルの物性や機能に及ぼす影響

甲南大学フロンティアサイエンス学部
○青山　星海，長濱　宏治

【緒言】近年、私たちは細胞を活用した新しい機能性材料として、生細胞を高分子で化学架橋したゲル（細胞架橋ゲル）を作製した（Figure 1）。細胞架橋ゲルでは、細胞にゲルの物理化学的性質を付与し、一方でゲルに細胞の性質や応答を付与できるため、従来の機能性材料が発現できないユニークな機能を示すと考えられ、再生医療や DDS などに有用な新規バイオマテリアルになると期待できる。細胞架橋ゲルでは、細胞種や高分子種を変化させることで、ゲルが示す機能のバラエティーを拡張できる。細胞架橋ゲルでは、細胞が高分子の三次元ネットワークと共有結合により繋がれ、束縛されている。一方で、生体内で細胞は、細胞外基質が構築する三次元ネットワークと物理的に結合している。つまり、細胞架橋ゲルの細胞は、生体では決して起こりえない特殊な状況に置かれている。本研究で私たちは、細胞架橋ゲルの特徴をより詳細に理解することを目的に、①細胞種の変化により細胞架橋ゲルの物性や機能は制御可能か、②ゲル内の特殊な三次元状態が細胞応答にどのように影響するのか、について調べた。

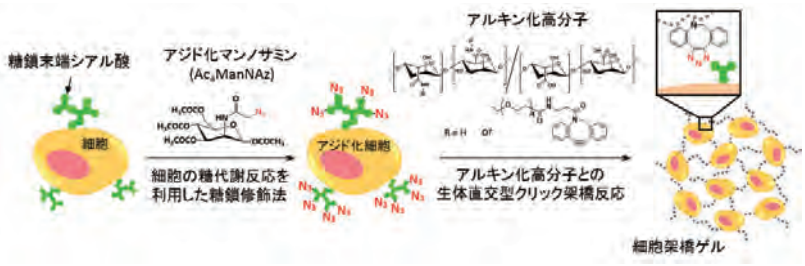


Figure 1. 細胞架橋ゲルの作製方法

【実験】ヒト神経芽腫細胞（SH-SY5Y）の培地にアジド化マンノサミンを加えて 3 日間培養し、膜タンパク質の糖鎖シアル酸へアジド基を導入した。アジド化細胞とアルキン化ローダミンを反応させ、共焦点顕微鏡観察によりアジド化効率およびアジド基の反応性を調べた。共焦点顕微鏡観察や生化学的なアッセイにより、アジド化細胞と非アジド化細胞の増殖率、接着面積、分化効率を比較した。アジド化細胞とアルキン化分岐型アルギン酸をクリック架橋反応させ、神経芽細胞架橋ゲルを作製した。ほかの細胞種を用いて同様にゲルを作製し、レオメータ測定によりゲルの力学物性を比較した。

【結果と考察】アジド化処置を行った神経芽細胞とアルキン化ローダミンを反応させると、細胞膜に沿ってローダミン由来の蛍光が見られたことから、細胞表面糖鎖シアル酸へアジド基導入が可能であり、そのアジド基はクリック反応可能であることがわかった。アジド基を導入した細胞は、非アジド化細胞よりも増殖性が低下し、接着面積は増大し、分化効率が向上することがわかった。これらの結果より、アジド基導入により細胞の接着機構が変化し、これによりシグナル伝達が変化し、増殖性が抑えられ、分化にシグナルがシフトしやすくなったのではないかと考えられる。細胞架橋ゲルで、細胞の化学架橋はゲルの力学特性に反映されることがわかった。神経芽細胞架橋ゲルと比べ、筋芽細胞架橋ゲルは著しく高い力学強度を示したことより、固有の力学特性が異なる細胞種を使い分けることで、ゲルの力学特性を変化させることができると示唆される。

Functional hydrogels generated by click cross-linking reaction between azide-modified cells with alkyne-modified polymers and effect of cell types on its physicochemical properties and functions

Seika AOYAMA and Koji NAGAHAMA
Department of Nanobiochemistry, Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University
Tel: +81-78-303-1328, Fax: +81-78-303-1495, E-mail: nagahama@center.konan-u.ac.jp

2P-053

ハイブリッドスフェロイド培養法を用いたリン酸カルシウム系材料の骨再生能の評価

東北大学大学院歯学研究科 [1]顎口腔機能創建学分野，[2]口腔システム補綴学分野，[3]歯学イノベーションリエゾンセンター，[4]九州大学 先導物質化学研究所
○佐藤 智哉[1,2]，穴田 貴久[1,4]，塩飽 由香利[1,3]，濱井 瞭[1]，土屋 香織[1]，佐々木 啓一[2]，鈴木 治[1]

【緒言】近年、再生医療の開発現場において、間葉系幹細胞（MSC）や iPS 細胞を用いた三次元の細胞組織体を生体外で作製することが盛んに行われている。三次元の細胞組織体の一つであるスフェロイド（球状細胞凝集塊）は細胞密度が高く、細胞同士が三次元的に接着するため、通常行われる平面培養に比べてより生体内に近い状態での培養が可能である。そのためスフェロイド培養は動物実験の代替法として、新薬開発のための薬剤スクリーニング法にも利用されている。

一方、骨再生医療におけるリン酸カルシウム系人工骨補填材の開発には *in vitro* での試験に加え、実験動物を用いた骨再生能の評価が未だ欠かせない。しかしスフェロイド培養は、リン酸カルシウム系人工骨補填材の骨再生能に関しても、動物実験に代わる迅速かつ簡便な評価系となりうる。既に我々は、MSC とリン酸カルシウム系材料のハイブリッドスフェロイドを構築する技術を開発し、ハイブリッド化する材料の種類によって MSC の骨芽細胞分化の程度が異なることを明らかにしている [1)]。そこで本研究では、リン酸カルシウム系人工骨補填材の骨再生能について動物実験に代わる評価系を開発することを目的に、*in vivo* におけるリン酸カルシウム系材料の骨再生能と、MSC のハイブリッドスフェロイド培養における骨芽細胞分化の関連性について検討した。

【実験】*in vivo* 試験として、顆粒径を揃えたリン酸カルシウム系材料を、マウス頭蓋冠規格化骨欠損部に埋入し、10 週間飼育後に骨を回収して新生骨の評価を行った。リン酸カルシウム系材料には、既存の人工骨補填材であるハイドロキシアパタイト（HA）、β リン酸三カルシウム（β-TCP）と、当分野で開発した骨再生材料の 1 つであるリン酸オクタカルシウム（OCP）を用いた。OCP は HA の前駆体と考えられており、間質細胞の骨芽細胞分化を促進することを報告している [2,3)]。

in vitro 試験として、マウス間葉系幹細胞株 D1 細胞とリン酸カルシウム系材料のハイブリッドスフェロイドを製作し、7 日間骨分化培養を行った。スフェロイド培養には、我々が開発した酸素透過性スフェロイド培養器（Oxy chip）を用いた [4)]。アルカリフォスファターゼ（ALP）活性とリアルタイム PCR 法による骨分化マーカーの測定を行い、*in vivo* 試験の結果と比較した。

【結果と考察】マウス頭蓋冠規格化骨欠損部での新生骨は、OCP 埋入群で最も多く形成された。ハイブリッドスフェロイド培養では、OCP との複合体で、ALP 活性が最も上昇し、骨芽細胞関連遺伝子の 1 つであるオステオポンチンの発現量も最も多かった。さらに、これらの新生骨量と、ALP 活性、オステオポンチンの発現量には、使用したリン酸カルシウム系材料ごとに特有の関連性がみられた。以上の結果から、MSC とリン酸カルシウム系材料で構成されるハイブリッドスフェロイドの骨分化培養を行い、その骨芽細胞分化について解析することにより、*in vivo* でのリン酸カルシウム系材料の骨再生能を *in vitro* で迅速かつ簡便に評価できる可能性が示唆された。

【参考文献】
1) Anada T, Sato T, Kamoya T et al., Regenerative Therapy, 2016; 3: 58-62, 2) Suzuki O, Japan Dental Science Review, 2013; 49: 58-71, 3) Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T et al.,Biomaterials, 2006; 27: 2671-2681, 4) Anada T, Fukuda J, Sai Y et al., Biomaterials, 2012; 33: 8430-8441

Comparative study on osteoconductive property of calcium phosphate materials by a 3D cell culture system

Tomoya Sato[1,2], Takahisa Anada[1,4], Yukari Shiwaku[1,3], Ryo Hamai[1], Kaori Tsuchiya[1], Keiichi Sasaki[2], Osamu Suzuki[1]
[1]Division of Craniofacial Function Engineering, [2]Division of Advanced Prosthetic Dentistry, [3]Liaison Center of Innovative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan, [4]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Fukuoka, Japan
Tel: +81-22-717-7635, E-mail: tomoya.sato.p7@dc.tohoku.ac.jp; suzuki-o@m.tohoku.ac.jp

2P-054

ラット先天性顎裂モデルにおける多能性前駆細胞を播種したEGCG結合ゼラチンの骨形成

[1]大阪歯科大学口腔インプラント学講座，[2]京都工芸繊維大学バイオベースマテリアル学専攻，
[3]大阪歯科大学中央歯学研究所
○笹山　智史[1]，原　朋也[1]，田中　知成[2]，本田　義知[3]，馬場　俊輔[1]

【緒言】唇顎口蓋裂や広域骨欠損部位での骨再生は未だ困難である。演者らは、緑茶由来エピガロカテキンガレート(EGCG)に注目し、EGCG をゼラチンに化学結合させた EGCG 結合ゼラチンスポンジ(EGCG-GS)を開発し、その骨再生研究を日々進めている。さらに、EGCG-GS に真空加熱を施した真空加熱型カテキンゼラチン(vhEGCG-GS)が、EGCG-GS や真空加熱型ゼラチン(vhGS)に比べ優れた骨再生能を示すことを明らかにした。しかし、骨再生用細胞播種材料としての有用性は明らかになっていない。本研究では、新規細胞播種担体の開発に向け、vhEGCG-GS の材料学的評価を行った。また、ラット先天性顎裂モデルに多能性前駆細胞である脱分化脂肪細胞(DFAT)と脂肪由来幹細胞(ADSC)を播種した vhEGCG-GS と vhGS を埋入し、骨形成能・機序を比較検討した。

【実験】vhEGCG-GS は、EGCG を豚皮膚由来タイプ A ゼラチンに化学結合させ、凍結乾燥、真空加熱処理(150ºC、24 時間)を施して作製した。対照実験として、同様の方法を応用し EGCG を含有しない vhGS を作製した。得られた両担体の材料学的評価に、走査型電子顕微鏡(SEM)観察、Zeta 電位測定、接触角測定を行った。両細胞は、F344 ラット雄 8 週齢の鼠径部より採取した脂肪組織から調整した。骨形成能は、同ラット雄 8 週齢 70 匹の顎裂欠損部(直径 2mm、高さ 4mm)に各試料を埋入し、4、8 週後マイクロ CT による骨形態計測と組織学的評価を行った。実験群として両担体へ DFAT あるいは ADSC を播種した群、対照群として非埋入群、vhGS、vhEGCG-GS 単独群の計 7 群(n=5)を用いた。さらに、*in vitro* にて細胞接着性を dsDNA アッセイと蛍光免疫染色、リン酸カルシウムの析出をフーリエ変換赤外分光分析と X 線光電子分光法を用いて評価した。統計解析には、一次元分散分析と Tukey-Kramer 法を用いた。

【結果と考察】SEM 観察、dsDNA アッセイ、蛍光免疫染色より vhEGCG-GS は vhGS に比べ細胞接着能に優れ、より多くの細胞を効率的に捕捉した。骨形態計測と組織学的評価より、両細胞とも vhEGCG-GS へ播種した群で優れた骨形成を認めた。また、Zeta 電位測定では、vhGS はプラスに帯電、vhEGCG-GS はマイナスに帯電していた。文献的考察によると EGCG は多様な薬理効果を持つが、本結果を考慮すると、EGCG の結合はゼラチン担体の表面性状を変化させ、効率的な多能性前駆細胞の捕捉、骨形成を増強させる新たな表面修飾方法となる可能性が示唆された。以上より、vhEGCG-GS は唇顎口蓋裂、広域骨欠損や外傷部位などの骨形成を促進させ、審美的な回復に貢献する新規細胞播種担体となりえる可能性が示唆された。

Osteogenesis of multipotent progenitor cells with the epigallocatechin gallate modified-gelatin sponge in rat congenital cleft jaw model

Satoshi SASAYAMA[1], Tomoya HARA[1], Tomonari TANAKA[2], Yoshitomo HONDA[3], Shunsuke BABA[1]
[1]Department of Oral Implantology, Osaka Dental University. [2]Department of Biobased Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology. [3]Institute of Dental Research, Osaka Dental University. Department of Oral Implantology, Osaka Dental University. 8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata, Osaka 573-1121, Japan. Tel: +81-72-864-3073, Fax: +81-72-864-3173, E-mail: sasayama@cc.osaka-dent.ac.jp

2P-055

光刺激で LCST が変化するスピロピラン導入 PNIPAm ブラシ表面の創製と細胞挙動制御

早稲田大学大学院　先進理工学研究科
○渡邉里奈, 長田和歩, 今任景一, 武田直也

【緒言】外部刺激により細胞接脱着を制御できる基材は、再生医療や組織工学への応用が期待されている。その中でも、生体環境下で 30 ℃付近に下限臨界溶液温度（LCST）を示し、その前後でぬれ性を大きく変化させる poly(*N*-isopropylacrylamide) （PNIPAm）ポリマーブラシを修飾した表面は、温度変化で細胞接脱着を制御でき、シート状細胞組織の回収も可能とした最も成功した基材と言える。この接脱着制御が局所的・即時的・低侵襲に刺激できる光で可能になれば、単一細胞操作や複雑な組織の作製など、さらなる発展が期待できる。そこで本研究では、光異性化で大きな極性変化を示すスピロピラン（SP）を PNIPAm 鎖中に導入することで、LCST を光制御可能な光応答性 PNIPAm を開発し、これを修飾したポリマーブラシ表面を作製した（Fig. 1）。また、PNIPAm は LCST 前後で coil—globule 転移による構造変化を起こす。そこで、細胞非接着性の poly(ethylene glycol)（PEG）も共にガラス基板表面に grafting to 法で修飾し、光応答性 PNIPAm の構造変化で PEG の表面露出度合いを変化させ、細胞接着性の光制御を試みた。

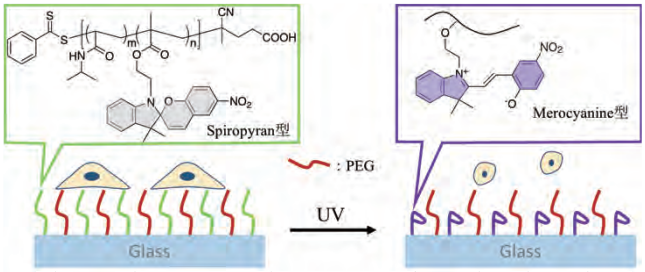


Fig. 1. Photoresponsive PNIPAm/PEG brush surface.

【実験】NIPAm および SP を導入した methacrylate 誘導体—SPMA—を 66.3:1.3（observed）の比率で共重合して poly(NIPAm-*co*-SPMA)を作製し、UV-Vis 分光光度計にて LCST 測定を行った。このポリマーと PEG をシランカップリング剤で導入した(3-glycidyloxypropyl)基を介してガラス基板に修飾し、混合ポリマーブラシ修飾表面を作製した。この際、PEG の量を変化させて細胞接着性の制御を試みた。基板は XPS と FT-IR で表面組成とグラフト密度の解析を行った。次いで、混合ポリマーブラシ修飾基板上にウシ大動脈血管内皮細胞（BAEC）を播種し、UV 光照射の有無による細胞接着性の差異を評価した。

【結果と考察】合成した光応答性 PNIPAm は、水中において LCST が 42 ℃であり、通常の細胞培養温度 37 ℃では水溶性となった。ここに UV 光を照射して SP を極性の高いメロシアニン（MC）へ光異性化すると、予想に反して LCST が 25 ℃へと低下した。これは、高極性の水中では UV 光未照射時にすでに SP の一部が MC となり、ポリマー鎖の水溶性を増加させた一方、UV 光照射で多くの MC が生じたことで MC 同士の凝集が起こったためと考えられる [1]。この光応答性 PNIPAm と PEG の混合ポリマーブラシ修飾基板上に BAEC を播種すると、特に両者の比率が 5:1 の表面では、UV 光未照射時に BAEC は良好に接着・増殖した一方、UV 光照射表面に対しては接着・増殖しにくいことが見出された（Fig. 2）。これは、光応答性 PNIPAm の LCST が 25 ℃へと低下することで、37 ℃の培養温度では globule 構造となり PEG 鎖が露出したためと考えられる（Fig. 1）。以上のように、本研究では細胞接着性の制御が可能な光応答性 PNIPAm ブラシ表面の開発を達成した。

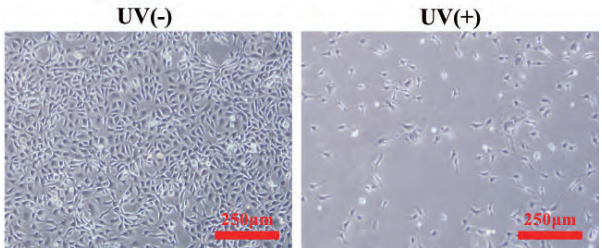


Fig. 2. Cell adhesion control by UV light irradiation.

1) E. Goldburt, et al, *Macromolecules* **1984**, 17:1225—1230.

Spiropyran introduced PNIPAm brush surface for photocontrol of LCST and cell adhesion behaviors

Rina WATANABE, Kazuho NAGATA, Keiichi IMATO, Naoya TAKEDA
Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University（TWIns）
Tel: +81-3-5369-7323, Fax: +81-3-5369-7323, E-mail: ntakeda@waseda.jp

2P-056

Influence of viscosity property of gelatin solution on chondrocyte functions

[1]Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki
[2]Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki
○Kyubae Lee[1,2], Naoki Kawazoe[1] and Guoping Chen[1,2]

【Introduction】Many studies have been conducted on how mechanical cues affect cell behavior by controlling matrix stiffness. These studies have revealed that matrix stiffness is one of the key parameters affecting cell function such as cell morphology, migration, proliferation, and differentiation. Such approaches have mainly focused on how matrix stiffness affects cell functions. In contrast to matrix elasticity, it is not clear how viscosity of fluids surrounding cells affects cell functions. In this study, aqueous solutions of gelatin with different viscosity were prepared and used for 3D culture of bovine articular chondrocytes (BACs) to investigate the effect of viscosity of gelatin aqueous solution on chondrocyte functions.

【Materials and Methods】Gelatin aqueous solutions with different concentration and viscosity were introduced in covalently crosslinked gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogel to construct a biphasic hydrogel, which had gelatin solution inner phase encapsulated with GelMA hydrogel outer phase. At first, BACs were mixed with gelatin solution having a concentration of 5, 10 or 15 % (w/w). Subsequently, the mixture suspension solution was casted in a silicone frame and cooled down to form a hydrogel sheet. The gelatin hydrogel gel sheet laden with chondrocytes was cut into microcubes with a nylon mesh. Finally, the cell-laden gel microcubes were mixed with GelMA macromers and crosslinked to generate GelMA hydrogels by UV-initiated crosslinking reaction. The chondrocyte-laden biphasic hydrogels were cultured at 37 °C and the gel microcubes became solution. The cell/hydrogel constructs were cultured up to 21 days. DNA amount in each hydrogel was quantified to evaluate cell proliferation. Cytoskeleton of BACs was stained with fluorescence-labeled phalloidin and observed with a confocal laser fluorescence microscope.

【Results and Discussion】The gelatin solutions with different viscosity showed different effect on the proliferation and cytoskeletal structure formation of BACs. Proliferation of BACs was enhanced in gelatin solution with a low viscosity, whereas suppressed in gelatin solution with a high viscosity. Observation by confocal laser fluorescence microscopy showed that BACs cultured in low-viscosity solution formed cube-shaped cytoskeletal structures faster than those in high-viscosity solution. Interestingly, BACs were constrained in the microcubes without migration to the bulk hydrogel regions. The results indicated that viscosity of microenvironment surrounding cells could affect cell functions.

Influence of viscosity property of gelatin solution on chondrocyte functions
Kyubae Lee[1, 2], Naoki Kawazoe[1], Guoping Chen[1, 2]
[1]Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science [2]Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba
Tel: +81-29-8604496, Fax: +81-29-8604673, E-mail: Guoping.CHEN@nims.go.jp

2P-057

Influence of cell morphology on gene transfection into mesenchymal stem cells

[1] 物質材料研究機構　機能性材料研究拠点，[2] 筑波大学　数理物質科学研究科
○楊　英俊 [1,2]，王　新竜 [1]，川添　直輝 [1]，陳　国平 [1,2]

【Introduction】Gene transfection, which is a technique for delivering exogenous genes into eukaryotic cells, is widely applied in researches on cell functions. In particular, gene transfection into primary cells such as mesenchymal stem cells (MSCs) remains still challenge because they are one of the typical difficult-to-transfect types of cells. Although various gene carriers have been developed, little attention has been paid to the effect of cell morphology on gene transfection efficiency. In the present study, we compared gene transfection efficiency for MSCs with different cell spreading and elongation to clarify the relationship between cell morphology and transfection efficiency. To do this, we prepared micropatterned surfaces with different cell spreading areas and aspect ratios by photolithography, cultured MSCs on the micropatterned surface, and transfected green fluorescent protein (GFP) genes into the micropatterned cells.

【Materials and Methods】Photoreactive poly(vinyl alcohol) (PVA) was micropatterned on a cell culture polystyrene plate surface by photolithography. The micropatterned surface had cell adhesive circles with different diameters of 20, 40, 60 and 80 μm to control cell spreading, and ellipses with different aspect ratios of 1, 2, 4 and 8 to control cell elongation. Then human MSCs were seeded on the micropatterned surface and cultured for 1 day. After culture, GFP expressing plasmid vectors (pAcGFP) were transfected into the micropatterned MSCs with Lipofectamine™ 2000. The gene transfection efficiency was evaluated by observing the green fluorescence of the cells. To further explore the mechanism underlying gene transfection on micropatterned surface, the cellular uptake capacity of cationic complexes was evaluated through cellular uptake amount of cationically modified FITC-labelled microspheres as a model. Additionally, the level of plasmid replication was analyzed through BrdU staining.

【Results and Discussion】The fluorescence images indicate that transfection efficiency increased with the increasing of spreading area and aspect ratio (Fig.1). To further explore the influence of cell morphology on the exogenous gene endocytosis and DNA replication in the gene transfection, the cellular uptake capacity and nuclear activity were also investigated. The results showed that the promoting effect of gene transfection by cell spreading area and aspect ratio might be attributed to the enhanced uptake of the cationic gene complexes and replication of exogenous genes. In conclusion, exogenous gene transfection into MSC was affected by cell spreading and cell elongation.

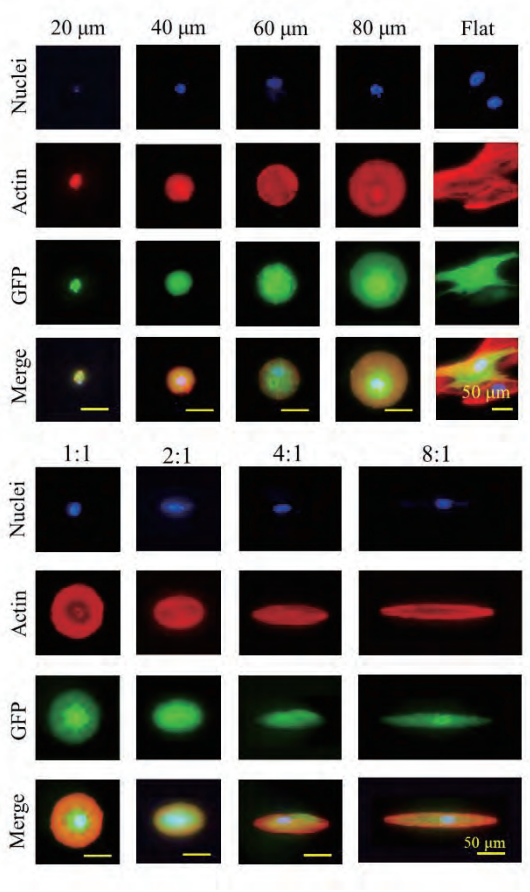


Fig. 1 Representative images of GFP positively expressed micropatterned MSCs with staining of nucleus (blue) and actin (red).

Influence of cell morphology on gene transfection into mesenchymal stem cells

Yingjun Yang[1,2], Xinlong Wang[1], Naoki Kawazoe [1], Guoping Chen[1,2]
[1]Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science
[2]Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba
Tel: 81-29-860-4496, Fax: 81-29-860-4706, E-mail: Guoping.CHEN@nims.go.jp

2P-058

細胞接着性ペプチドをリガンドとした温度制御型細胞分離

[1] 慶應義塾大学大学院薬学研究科
○志村 昌紀[1]，花屋 賢悟[1]，蛭田 勇樹[1]，長瀬 健一[1]，金澤 秀子[1]

【緒言】

従来の医薬品による治療法が確立していない疾患に対して、細胞を移植する再生医療の発展が期待されている。この再生医療において、特定の細胞を抗体で標識せずに効率よく分離する技術が望まれている。本研究では、細胞の修飾をしない細胞分離を目的として、ガラス基板表面に温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)を修飾し、末端に細胞接着性ペプチドを導入した機能性表面を開発した。温度による細胞の接着性・脱着性を観察する事で細胞分離用基材としての特性を調べた。(Fig. 1)

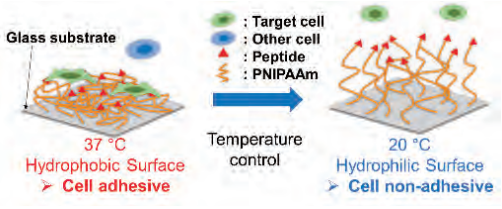


Fig. 1 Cell separation system using thermoresponsive polymer and cell adhesive peptides.

【実験】

Fmoc保護アミノ酸を用いた固相ペプチド合成法により、細胞接着性を有する環状ペプチド c(RGDfK)-N3 を合成した。続いて以下の手順でペプチド導入 PNIPAAm 修飾基板を作製した(Fig. 2)。表面開始可逆的付加-開裂連鎖移動(RAFT)重合によりガラス基板の表面に PNIPAAm を修飾し、末端にアルキン部位を導入した。合成したアジド化ペプチドを用いて、クリックケミストリーとして知られるアジド-アルキンの環化付加反応により PNIPAAm 鎖末端に細胞接着性ペプチドを導入した。作製した基板をペトリディッシュに固定し、ヒト臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hbmMSC)を播種し、37 °C での接着挙動と 20 °C での脱着挙動を観察した。

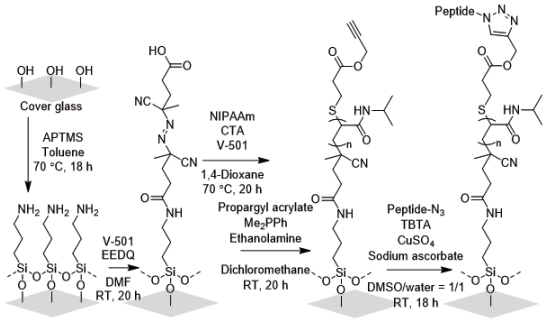


Fig. 2 Scheme for preparation of cell adhesive peptide modified PNIPAAm glass substrates.

【結果と考察】

作製したガラス基板に細胞を播種し 37 °C でインキュベーションしたところ、接着速度は HUVEC よりも MSC の方が大きかった。20 °C でインキュベーションすると、HUVEC は 1 時間程度でほとんどが脱着したのに対し、MSC は脱着が遅いという結果が得られた。また、ペプチド修飾基板は、未修飾基板と比較して高い初期接着速度を示した(Fig. 3)。これらの結果より、PNIPAAm 修飾基板を用いることで、細胞種による脱着速度の差を用いて、温度変化のみによる細胞分離の可能性が示された。細胞接着性ペプチドの修飾により細胞の初期接着速度が増加することで、細胞分離プロセスにかかる時間を短縮することが可能となった。また、細胞選択性を持つペプチドを用いることで、より選択性の高い分離に応用できる可能性が示された。

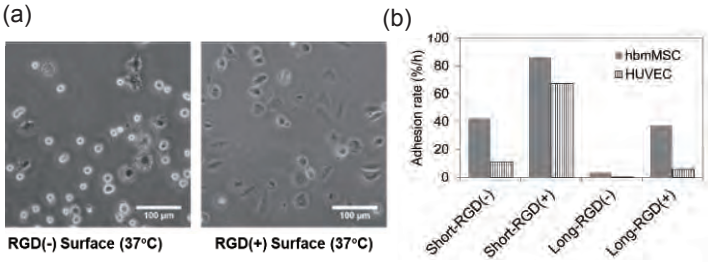


Fig. 3 Cell adhesion behavior on PNIPAAm brush with and without peptide (a), and initial cell adhesion rate on each surface (b).

Temperature-controlled Cell Separation System using Cell Adhesion Peptides

Masaki Shimura[1], Kengo Hanaya[1], Yuki Hiruta[1], Kenichi Nagase[1], Hideko Kanazawa[1]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University
Tel: +81-3-5400-1378, Fax: +81-3-5400-1378, E-mail: nagase-kn@pha.keio.ac.jp

2P-059

ゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞凝集体の振盪培養

[1]京都大学　ウイルス・再生医科学研究所　生体材料学分野, [2]東京理科大学薬学部薬学研究科　薬品物理化学研究室
○新居　輝樹[1,2], 牧野　公子[2], 田畑　泰彦[1]

【緒言】

細胞を 3 次元に凝集させた細胞凝集体は、その生物活性が高まることから、再生医療、創薬研究への応用が期待されている。しかしながら、これまでの細胞凝集体に関する研究においては、凝集体内部の環境に対する工夫がなく、凝集体内部への酸素や栄養の供給が悪いことにより、細胞の生存と機能状態がよくないことが問題となっていた。この問題を解決する方法として、細胞になじむ性質をもち、かつ生体吸収性のゼラチンからなるハイドロゲル粒子を作製した。この粒子をマウス頭蓋冠由来株（MC3T3-E1）細胞とともに培養することによって、ゼラチン粒子を内部に均一に含む細胞凝集体を作製してきた。本研究では、ゼラチン粒子の量を変化させ、かつ凝集体内部への酸素や栄養の供給状態を改善するために振盪培養法を適用した。これらの工夫による細胞凝集体の機能変化について調べた。

【実験】

ゼラチン(牛骨由来、等電点 5.0、重量平均分子量 1.0×10^5、新田ゼラチン株式会社から供与)の 10 wt％水溶液(W)を調製し、それをオリーブオイル(O)中で攪拌することにより、W/O エマルジョンを形成させた。このエマルジョンを 0 ℃まで冷却し、ゼラチン水溶液をゲル化させた。その後、冷却アセトンを用いて、未架橋ゼラチン粒子を遠心洗浄により回収した。ゼラチン粒子をシーブ(20, 32, および 53 μm 孔径）により分画、粒子径別に回収した。次に、未架橋ゼラチン粒子を減圧下、140 ℃で所定時間、熱脱水処理することにより架橋ゼラチンハイドロゲル粒子を得た。

96well 培養 plate（U 底)の各 well にポリビニルアルコール（PVA、日本酢ビ・ポバール株式会社、重量平均分子量= 8.8×10^4、鹸化度 88.0 mol%)のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液（100 μl）を加え、37℃で 15 分間、放置した。その後、PVA 水溶液を吸引除去し、PBS 溶液で 2 回洗浄することで、well 底面の PVA コーティング処理を行った。ゼラチンハイドロゲル粒子を 10 vol %のウシ胎児血清を含有した αMEM（以下、標準培地)中に懸濁した（0、1×10^3、2×10^3、3×10^3および 4×10^3個/ml)。この粒子懸濁液 50 μL と MC3T3-E1 の標準培地懸濁液（2×10^4 cells/ mL）100 μl を混合した後、各 well に滴下した。37℃、5% CO_2の条件下で静置培養し、細胞凝集体を作製した。その後、振盪培養（30 rpm)もしくは静置培養にて細胞凝集体を培養した。

培養 1、2、および 3 週間後の細胞凝集体に対して、凝集体のサイズを Image J を用いて測定した。加えて、細胞あたりの ATP 量およびミトコンドリア活性を測定した。

【結果と考察】

ゼラチンハイドロゲル粒子と細胞との混合比、振盪培養の有無によらず、U 底 well 中に細胞凝集体の形成が見られた。細胞に対するゼラチンハイドロゲル粒子の混合比率が高くなるとともに、細胞凝集体のサイズは大きくなった。また、ゼラチンハイドロゲル粒子を含有した細胞凝集体において、培養 2 週間まではサイズは変化しなかったが、3 週間後ではそのサイズが小さくなった。これは、細胞凝集体内のゼラチンハイドロゲル粒子の分解が影響していると考えられる。ゼラチンハイドロゲル粒子の混合比率が低い場合には、静置培養と比較して、振盪培養された細胞凝集体の細胞当たりの ATP 量とミトコンドリア活性は有意に高くなった。これに対して、ゼラチンハイドロゲル粒子比率が高くなると振盪培養による影響は見られなかった。これらの結果は、低いゼラチンハイドロゲル粒子比率では、振盪による培養液の動きが、凝集体内の細胞機能に影響することを示している。

Shaking culture of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel spheres.

Teruki Nii[1,2], Kimiko Makino[2] , and Yasuhiko Tabata[1]

1, Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawara-cho Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

2, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641, Yamazaki, Noda, 8510, Japan

Tel: 075-751-4108, e-mail: niiteruki@gmail.com

2P-060

マウス頭蓋骨初期石灰化機構を模倣した新規石灰化技術の開発

[1] 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野，[2] 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野，[3] 岡山大学病院矯正歯科
○国富　陽介[1,3]，エミリオ　サトシ　ハラ[1]，岡田　正弘[1]，上岡　寛[2]，松本　卓也[1]

【緒言】
近年、生体機能や特性を模倣し工学や医療へ応用するバイオミメティクス(生体模倣)が注目されている。骨誘導材料においても骨組織の構成を模倣した材料の開発が進められている。しかし初期石灰化を模倣した骨誘導材料は未だ開発されておらず、初期石灰化をモノづくりの観点で理解する試みが少ないことがその要因の一つと考えられる。そこで本研究ではマウス頭蓋骨の初期石灰化について注目し、材料学的、形態学的、結晶学的手法と分子生物学的手法とを融合し、頭蓋骨初期石灰化機構の理解を進めた。さらに、今回の研究を通じて得られた知見を応用し、生体外で頭蓋骨初期石灰化を模倣した新規石灰化技術の開発を試みた。

【実験】
胎生 13.5 日から 15.5 日および出生後の ICR マウス頭蓋骨を採取し、マイクロ CT、組織学的染色、走査型電子顕微鏡(SEM)観察により初期石灰化開始時期および部位を同定し、透過型電子顕微鏡(TEM)観察により詳細な構造を確認した。さらに SEM 観察により確認された石灰化小球に対して定量を行うことで経時的な大きさの変化を比較し、電子線回折により定性評価を行った。生体外で初期石灰化組織を作製するため、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を osteogenic medium の条件下で 5 日間培養し、超遠心分離により基質小胞を抽出した。さらに基質小胞を超音波処理により断片化し、コラーゲンゲルと共にα-MEM、10 mM β-glycerophosphate の条件下で 7 日間培養し、組織学的染色、SEM 観察、電子線回折により石灰化組織の定性評価を行った。

【結果と考察】
マイクロ CT、組織学的染色より頭蓋骨の骨発生は胎生 14 日頃に前頭骨および頭頂骨から開始することが分かった。初期石灰化領域では小胞様構造物がみられ、TEM 観察から脂質二重膜様構造を示すことが確認された。さらに石灰化領域では結晶様構造物が存在し、電子線回折よりハイドロキシアパタイトであることが明らかとなり、定量比較結果から経時的な結晶成長が確認された。今回の観察を通じて、マウス頭蓋骨初期石灰化は骨芽細胞からのコラーゲン線維放出、骨芽細胞からの基質小胞放出、基質小胞を元にした結晶成長という 3 段階により進行することが示唆された。この機構を応用し生体外で初期石灰化組織の作製を試みた結果、SEM 観察から結晶様構造物が確認され(Fig. 1A)、電子線回折よりハイドロキシアパタイトであることが示された(Fig. 1B)。今回の研究により、基質小胞およびコラーゲン線維の相互関係を利用し初期石灰化起始点を作り出すことに成功した。今後はより生体組織に近似した骨誘導材料開発のため血管など石灰化周囲組織との関係性を精査し材料開発へ応用する予定である。

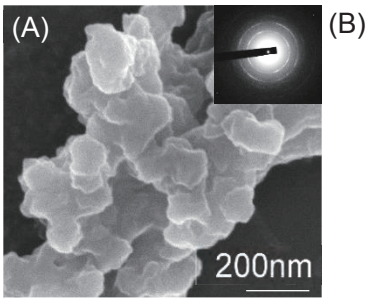


Fig.1 (A) SEM image of the minerals formed inside the collagen gel containing MV nanofragments., (B) Electron diffraction analysis of the minerals showing that the minerals are hydroxyapatite.

Biomimetic mineralization mimicking initial bone formation of mouse calvaria

Yosuke Kunitomi[1,3], Emilio Satoshi Hara[1], Masahiro Okada[1], Hiroshi Kamioka[2], Takuya Matsumoto[1]
[1]Department of Biomaterials, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan [2]Department of Orthodontics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan [3] Department of Orthodontics, Okayama University Hospital, Okayama, Japan
Tel: +81-86-235-6667, Fax: +81-86-235-6669, E-mail: pcb89v5i@s.okayama-u.ac.jp

2P-061

ヒアルロン酸ナノファイバーシートを足場とした上皮組織細胞の三次元培養

[1] 東京薬科大学生命科学部, [2] 東京薬科大学大学院生命科学研究科
○ 久保田　萌[1], 川西　隆仁[2], 青木　元秀[2], 熊田　英峰[2], 梅村　知也[2], 内田　達也[2]

【緒言】　上皮細胞には扁平・円柱・立方状など様々な形態があり、それらが単層あるいは重層化することで上皮組織を形成している。上皮組織の最下層では、幹細胞性を有する立体的な細胞が分化・増殖することが知られている。*In vitro* で上皮組織を再構築する際、硬い足場上で細胞が伸展しつつ幹細胞性が損なわれる可能性が危惧される。当研究グループでは細胞の伸展を抑制しつつ培養可能な足場として、ヒアルロン酸ナノファイバーシート(HNFS)を開発した（第 6 回生物工学会コロキウム, 2018）。本研究では、HNFS を足場として正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)の三次元培養を試みた。培養細胞組織の分化増殖状態を蛍光免疫染色法で形態学的に評価し、細胞およびその周囲の微細構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

【実験】　ヒアルロン酸ナトリウム(Mw < 1000k)を化学修飾したのち、ポリエチレンオキシド、ミリ Q 水、N,N ジエチルホルムアミド混合溶液を加えることで、ヒアルロン酸ポリマー溶液を調製した。この溶液を原料とし、エレクトロスピニング法によりカバーガラス上に紡糸後、*in situ* 架橋した。これをエタノール、ミリ Q 水および液体培地で逐次洗浄し、HNFS を得た。24 ウェルプレートの底面に設置した HNFS 上に任意量の NHEK を播種した。培養条件は二酸化炭素濃度 5 %、37 ℃、任意の培地中カルシウム濃度(0.06～1.4 mM)とし、1 日間または 5 日間培養した。また、コントロールとしてカバーガラス上に同一条件で NHEK を培養した。各試料は適切な前処理後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で細胞核、アクチンフィラメント、増殖関連タンパク質、分化マーカータンパク質の局在を三次元的に観察した。SEM 観察用試料は、t-ブチルアルコールで置換後凍結乾燥し、化学気相蒸着法でオスミウムを被覆した。

【結果と考察】　HNFS に播種した NHEK は培養期間に関わらず、播種時の球体を保ったままシート上層の網目構造内部に包埋されている(Fig. 1B)。細胞とファイバーの接点には、細胞とファイバーが融合している様子が確認できる。NHEK は、表面のヒアルロン酸レセプターである CD44 を介してファイバーをヒアルロン酸として認識しつつ網目構造に沿ってシート内層部へと遊走したことが示唆される。また、ヒアルロン酸を認識することで、ヒアルロン酸の取込・分解と再分泌により細胞とファイバーの融合が生じたものと考えられる。5 日間の培養では細胞がファイバーと絡み合いながら三次元的に分裂・増殖しており、一部ではスフェロイド様の組織体形成が確認できる。これらの組織体において顕著なストレスファイバーおよび接着班の形成は認められず、インテグリン分子群を介したシグナルカスケードは抑制されているものと推定する。一方、カバーガラスで培養した NHEK(Fig. 1A)は、分裂・増殖するものの典型的な伸展形態を示し、ストレスファイバー、接着班、仮足の形成が顕著であり、分化ステージの進行が強く示唆される。HNFS を上皮細胞の培養足場として用いることで、組織最下層の幹細胞性を維持し、正常な上皮組織の三次元培養が可能になるものと期待できる。

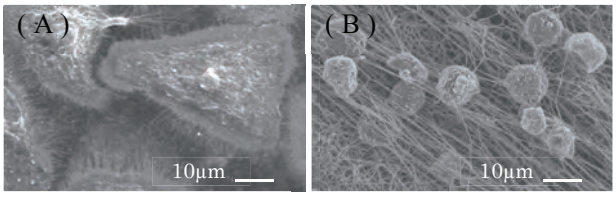


Fig1.カバーガラス上で 1 日培養した NHEK(A)と HNFS 上で 1 日培養した NHEK(B)の SEM 画像

3D cell culture using hyaluronan nanofiber networks toward epithelium tissue reconstruction

Megumi Kubota[1], Ryuto Kawanishi[2], Motohide Aoki[2], Hidetoshi Kumata[2], Tomonari Umemura[2], Tatsuya Uchida[2]
[1]Department of Life Sciences Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
[2] Graduate School of Life Sciences Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences
Tel: +81-42-676-5093, Fax: +81-42-676-6354, E-mail: uchi@toyaku.ac.jp

2P-062

組織接着性を有する温度応答型生分解性インジェクタブルゲルの開発

[1] 関西大化学生命工，[2] 関西大 ORDIST, [3] 関西大医工薬研セ
○藤原　壮一郎 [1)]，永田　拓也 [1)]，能﨑　優太 [2)]，葛谷　明紀 [1,3)]，大矢　裕一 [1,3)]

【緒言】我々はこれまでに，生体外ではゾル（溶液）状態で，生体内に注入すると体温に応答して *in situ* でヒドロゲルを形成する温度応答型インジェクタブルポリマー (IP) として，ポリ（カプロラクトン-グリコール酸）(PCGA)とポリエチレングリコール (PEG) からなるトリブロック共重合体：PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA (tri-PCG) の医療応用について検討してきた [1)]。その応用例として，腹腔鏡手術下において使用可能な癒着防止材や，カテーテルを利用して治療目的で一時的に血管を塞栓する材料としての研究を進めている。こうした用途では，形成した IP ゲルが塗布した組織表面から離れると，期待される機能が発揮されないため，組織に適当な強さで接着することが望まれる。しかし，tri-PCG のみでは組織接着性が不足している。そこで，生体組織を構成している細胞表面の膜タンパク質や細胞外マトリックスに存在しているアミノ基と化学的に反応する官能基を IP に導入することを考えた。

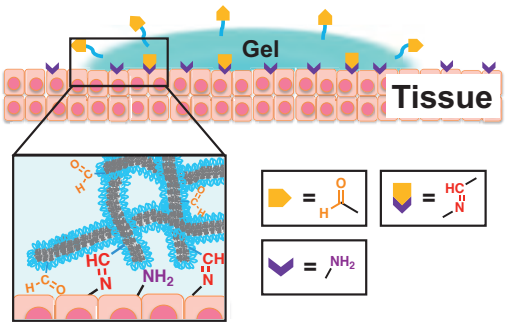


Figure 1. Schematic illustration of tissue adhesion of injectable polymer hydrogel having aldehyde groups.

本研究では，生体内で温度に応答してゲルを形成した際にゲル表面に，アミノ基と反応してシッフ塩基結合を形成するアルデヒド基を露出させ，生体接着性を発現するIPを設計した。ここで，tri-PCGは，疎水性部 (PCGAセグメント) をAブロックとした両親媒性ABA型トリブロックコポリマーであり，単にポリマー末端にアルデヒド基を導入した場合，ミセルコア近傍にアルデヒド基が位置する結果となり，ポリマーネットワークと水相の界面にアルデヒド基を露出させる事ができないと予想される。そこで，親水性セグメントと疎水性セグメントを逆転させた構造のBAB型ポリマーの末端にアルデヒド基を導入することを考えた。今回は，BAB型ポリマーとしてPEGを親水性鎖としポリプロピレングリコール (PPG) を疎水性鎖とした市販の温度応答性ポリマーPluronic (PEG-*b*-PPG-*b*-PEG) P-123を使用し，その末端にアルデヒド基を導入したポリマーを合成し，これをtri-PCGと混合することで，組織接着性を付与した温度応答型IP製剤の開発を試みた(Fig. 1)。

【実験】 Pluronic P-123（PEG 重合度 20，PPG 重合度 70，分子量 5,800）と terephthalaldehydic acid (TAA)を THF に溶解し，dicyclohexylcarbodiimide (DCC)と dimethylaminopyridine (DMAP)を用いて脱水縮合を行い，アルデヒド基修飾 Pluronic を合成した。アルデヒド基の反応性を確認するため，得られたポリマー(Pluronic-CHO)とアミノ基を有するポリマー(Poly-L-Lysine)を水溶液中で混合した。次に，この Pluronic-CHO を tri-PCG に混合して作成した IP 製剤を食用の豚肝スライスに挟んでゲル化させて固定し，接着面と平行方向にせん断応力をかけて引張試験を行い，破断に至る最大応力の値から組織接着力を評価した。

【結果と考察】 ^{1}H-NMR の測定結果から TAA の導入率を算出したところ，約 97%であった。Poly-L-Lysine との反応による粘度の増大により，Pluronic-CHO がアミノ基に対する反応性を有していることが確認された。組織接着力の試験により tri-PCG に対する Pluronic-CHO の混合割合を増加させると，接着強度が上昇することが分かった。

【参考文献】 1) Y. Yoshida, Y. Ohya *et al., Polym J.*, **2014**, *46*, 632-635.

Development of temperature-responsive biodegradable injectable hydrogel system having tissue adhesive property

Soichiro FUJIWARA[1], Takuya NAGATA[1], Yuta YOSHIZAKI[2], Akinori KUZUYA[1,3], Yuichi OHYA[1,3]
([1]Faclulty of Chemistry, Matererials and Bioengineering, Kansai University, [2]ORDIST, Kansai University. [3]CEMP, Kansai University, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan)
Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

2P-063

温度応答性パターン化基材からフィブリンゲルへの連続培養による配向神経筋組織の作製

[1] 早稲田大学大学院　先進理工学研究科，[2] 東京女子医科大学　先端生命医科学研究所
○及川　富美子[1,2]，高橋　宏信[2]，清水　達也[2]，武田　直也[1]

【緒言】神経筋疾患の機序解明と治療法確立のためには、生体組織の構造と機能を再現した神経筋組織モデルの開発が求められている。これまでに演者らでは、一方の構成要素の筋組織については、温度応答性パターン化基材を用いて、ヒト筋芽細胞が同一方向に配向・伸展・融合して形成される骨格筋組織を作製することに成功している。次の段階は、神経組織を導入して、神経からの情報によって運動機能が制御される神経と骨格筋の複合組織モデルを構築することである。そこで本研究では、温度応答性パターン化基材による配向化骨格筋組織の作製操作に続いて、ゲル培養を組み合わせて筋組織の成熟化を図るとともに、ここに神経細胞を播種して共培養し、配向化筋組織と神経細胞からなる複合組織の構築を目指した。

【実験】ポリ(*N*-イソプロピルアクリミド)(PIPAAm)が表面に修飾された温度応答性培養皿に、フォトマスクのパターンフィルム（露光 50 μm 幅/遮光 50 μm 幅）を用いて、親水性高分子のポリアクリルミドを 50 μm 幅のストライプ状に光重合した（Fig.1A）。このパターン化基材にヒト筋芽細胞を播種し、コンフルエントになるまで培養した後にマトリゲル含有のフィブリンゲルで組織を包埋した。次いで、低温化によりゲルごと骨格筋組織を培養皿から回収し、筋芽細胞上にヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を播種して数週間共培養を行った。この系において、筋と神経それぞれの組織の構造や配向性、ならびに神経と筋のシグナル伝達に重要な神経筋接合部（neuromuscular junction；NMJ）の形成を蛍光免疫染色により評価した。また、骨格筋組織の機能評価として、電気刺激による収縮挙動を観察した。

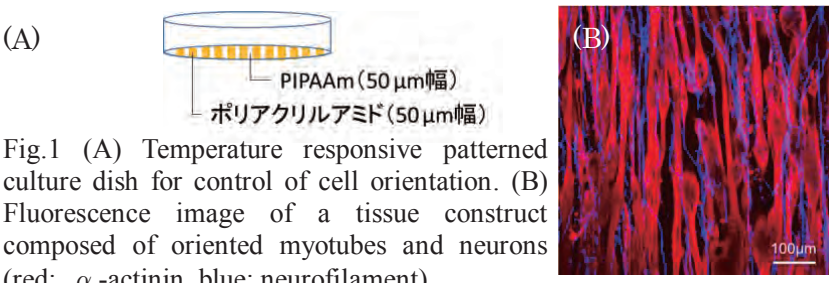


Fig.1 (A) Temperature responsive patterned culture dish for control of cell orientation. (B) Fluorescence image of a tissue construct composed of oriented myotubes and neurons (red: α-actinin, blue: neurofilament).

【結果と考察】蛍光免疫染色の結果から、筋芽細胞は培養基材のパターンに沿って配向・融合し、同一方向に配向した筋管を形成することが見出された（Fig.1B）。また、マトリゲル含有フィブリンゲルを用いて培養した骨格筋組織はサルコメア構造を有し、膜表面にラミニンの発現も確認され、成熟した組織の形成が示唆された。これらの成熟した組織の形成は、ゲル培養場にマトリゲルを添加することで顕著に促進されることも見出された。一方、神経細胞についても、筋管に沿って神経突起を伸長させる様子が観察された（Fig.1B）。さらに、NMJ において神経細胞からのシグナルを受け取るアセチルコリンレセプター（AChR）が筋管表面に存在することも確認され、運動神経の軸索が AChR に隣接している構造も見られた。これらの結果から、骨格筋組織内に NMJ が形成されたことが示唆された。また、電気刺激（10 V, 10 ms, 1 Hz）の負荷によって、この神経筋組織が収縮する様子も観察され、生体の構造と機能を模倣した複合組織を構築できたと考えられた。今後、グルタミン酸等により神経細胞のみを刺激しても筋収縮が誘起されるかを評価し、NMJ を介したシグナル伝達能を有するヒト神経筋組織モデルであることを示していく予定である。

Fabrication of combined tissue constructs composed of oriented skeletal muscles and motor neurons by successive cultures using a temperature responsive patterned substrate and a fibrin gel

Fumiko OIKAWA[1,2], Hironobu TAKAHASHI[2], Tatsuya SHIMIZU[2] and Naoya TAKEDA[1]
[1]Department of Life Science and Medical Bioscience, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University (TWIns), Tokyo, Japan. [2]Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University (TWIns), Tokyo, Japan
Tel&Fax: +81-03-5369-7323, E-mail: takahashi.hironobu@twmu.ac.jp, ntakeda@waseda.jp

2P-064

マイクロカプセル培養下での生理活性ペプチドの *in situ* conjugation

[1] 東京大学大学院工学系研究科 [2] 東京大学大学院医学系研究科
○大木　悠一朗[1]，太田　誠一[2]，大庭　伸介[1,2]，伊藤　大知[1,2]

【緒言】欠損組織に対する前駆細胞の移植による治療は近年注目されている。しかし、実用化には目的組織の細胞への大量の分化が必要であり、現状は分化効率が低い上に高コストである点が課題である。生体内では細胞の機能発現・分化が細胞外マトリクスや液性因子によって制御されていることから、分化段階に応じ微小環境を動的に制御可能な三次元スキャホールド中での培養によって、分化効率を向上できることが期待される。そこで本研究では三次元スキャホールドとしてアルギン酸マイクロカプセルを用い、微小環境を動的に変化させる手段として生理条件下で進行可能なマレイミド・チオール反応を利用した。細胞封入マレイミド修飾アルギン酸(Alg-Mal)カプセルに対しチオール基を持つ BMP-2 模倣ペプチドを *in situ* conjugation し、動的な骨分化誘導を目指した。

【実験】

2.1 平面培養下での BMP-2 による骨分化誘導

骨分化マーカーである Col1産生時に GFP を発現する骨前駆細胞 MC3T3E1を、維持培地のみ、及び BMP-2含有培地を用いて1週間平面培養した。培養後、フローサイトメトリーにより GFP 蛍光強度の定量を行った。

2.2 カプセル培養下でのペプチドの *in situ* conjugation

MC3T3E1を封入した Alg-Mal カプセルを作製し、培養した。1日後、チオール基を持つ BMP-2 模倣ペプチドである CDWIVA 又は CG-BMP-2 knuckle epitope peptide (CG-BMP-2 KE Pep)、チオール基を持たない DWIVA 又は BMP-2 KE Pep を添加しさらに6日間培養した。比較対照として維持培地のみ、及び BMP-2を含む骨分化培地を用いた。培養後、フローサイトメトリーによる GFP 蛍光強度の定量を行った。

【結果と考察】

3.1 平面培養下での BMP-2 添加による骨分化評価

GFP の蛍光強度は維持培地での培養と比較して、BMP-2の添加により2.1倍まで有意に上昇した。Col1は骨分化マーカーであるため、BMP-2は平面培養下では骨分化を促進することが示唆された。

3.2 Alg-Mal カプセル培養下での生理活性ペプチドの *in situ* conjugation による骨分化評価

Col1産生時に発現される GFP の蛍光強度をフローサイトメトリーで定量した結果を Fig. 1に示した。GFP の蛍光強度はコントロールと比較して、チオール基を持った BMP-2模倣ペプチドの添加により1.5倍程度まで有意に上昇した。一方でチオール基を持たない2種の BMP-2模倣ペプチドを添加したことによる GFP 蛍光強度に有意差は見られなかった。これらの結果より、これらのペプチドの骨分化誘導能を Alg-Mal マイクロカプセルに *in situ* conjugation することで付与できることが示唆された。また BMP-2の添加による GFP 蛍光強度に有意差が見られなかったことから BMP-2がカプセル内へ拡散する前に失活した可能性が考えられる。以上より、本培養システムにおいて、様々な生理活性ペプチドを添加することでカプセル内へと拡散し *in situ* conjugation による細胞の機能発現・分化制御が期待できると考えられる。

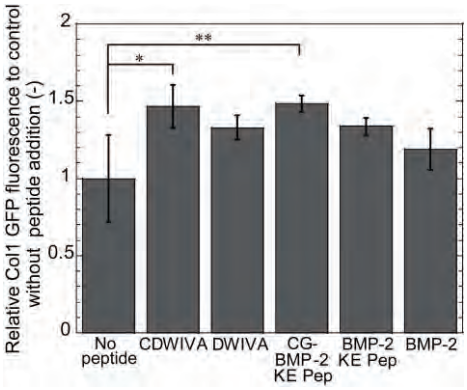


Figure 1. Effect of *in situ* conjugation of bioactive peptides on encapsulated-cell differentiation by flow cytometry. (N= 4, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$)

***In situ* conjugation of bioactive peptides in microcapsule culture**

Yuichiro Oki[1], Seiichi Ohta[2], Shinsuke Ohba[1,2], Taichi Ito[1,2]
[1]School of Engineering, The University of Tokyo, [2]School of Medicine, The University of Tokyo
Tel: +81-3-5841-1425, Fax: +81-3-5841-1697, E-mail: taichi@m.u-tokyo.ac.jp

2P-065

毛包原基を用いた皮膚組織の作製

[1] 横浜国立大学大学院・工学府，[2] 神奈川県産業技術研究所
○楯　芳樹[1]，景山　達人[1,2]，福田　淳二[1,2]

【緒言】

我々の体表面を覆う皮膚は、表皮と真皮、毛包や皮脂腺などの皮膚附属器により構成され、表皮のバリア機能に加え、毛髪による紫外線からの保護や皮脂や汗による水分調節など様々な器官が関わって機能している。再生医療の分野では、表皮と真皮の 2 層構造を生体外で再現した培養皮膚と呼ばれる組織構築技術が開発され、薬物の透過性や刺激などを簡潔に予測できる画期的なツールとして製薬企業などで利用されてきた。しかし、従来の培養皮膚は皮膚附属器を含んでおらず、皮膚本来の機能を十分に発揮することが不可能であった。一方、我々は、皮膚附属器の 1 つである毛包の原基を大量調製する技術を開発し、これをマウスに移植することで毛周期を繰り返す毛髪が再生できることを示してきた（T. Kageyama et al. Biomaterials, 154, 291-300, 2018）。本研究では、この毛包原基を皮膚組織作製時に導入することで、皮膚附属器を備えた皮膚組織の構築を目指した。

【実験】

マウス皮膚から採取した上皮系細胞と間葉系細胞を 1:1 の比率で混合し、2×10^4 cells/well ずつ細胞非接着丸底ウェル培養器に播種した。2 種類の細胞は、1 つの凝集体を形成した後、3 日間の培養中に自発的に凝集体内で分離することで、毛包原基を形成した。この毛包原基 50 個を、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を含む細胞懸濁液に混合し、セルカルチャーインサートに播種し、1 日培養することで毛包原基を含むシート状組織を作製した。続いて、皮膚附属器を備えた皮膚を再生できるかを評価するために、チャンバー法によるマウスへの移植を行った。すなわち、ヌードマウスの背部皮膚を丸く切りとり、シリコーン製の円筒チャンバー（直径 7.0 mm、高さ 7.5 mm）を取り付けることで移植床を作製し、そこに作製した培養皮膚を移植した。

【結果と考察】

培養器に播種した 2 種類の細胞は 1 日目に 1 つの凝集体を形成した後、3 日間の培養で 2 種類の細胞が凝集体内で分離した毛包原基構造を自発的に形成する様子が観察された。発生過程の毛包原基は、毛包形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）が間葉系細胞において発現することが知られている。作製した毛包原基で ALP の発現を評価した結果、発生初期と同様に、間葉系細胞において ALP の発現が確認された。

移植 4 週後には毛髪を有する皮膚組織の構築が確認された。移植皮膚切片の組織染色の結果より、再生した皮膚内に毛包の形成が観察され、毛幹が表皮を貫通している様子も確認された。再生した毛幹を走査型電子顕微鏡で観察すると、生体の毛幹と同様に特徴的なキューティクル構造を有していた。本実験で調製した毛包原基は未分化性の高い胎児皮膚由来の細胞を使用している。そのため、発生過程と同様の上皮－間葉相互作用により、毛髪の再生も構築されたと考えられる。

Biomaterials: Engineering skin tissue constructs with hair follicles germ

Yoshiki Tate[1], Kageyama Tatsuto[1,2] , Junji Fukuda [1,2]
[1]Fuculty of Engineering, Yokohama National University
[2]Kanagawa Institute of industrial Science and Technology
Tel: 045-339-4008 Fax: 045-339-4008, E-mail: fukuda@ynu.ac.jp

2P-066

塗布ピン方式による微細塗布装置を用いた心筋組織の作製

[1]NTN 株式会社　商品開発研究所，[2]大阪大学大学院　生命機能研究科
○近江 祥平[1, 2]，山中　昭浩[1]，小田　淳志[1, 2]，中村　陽香[1]，赤木　隆美[2]，明石　満[2]

【緒言】
細胞操作により生体組織を人工的に構築した三次元組織モデルは、再生医療への応用や動物実験に替わる新たな創薬支援ツールの開発、および生命科学の基礎研究など広い用途で求められている。これまでに三次元組織の作製方法に関して、細胞をシート状に培養・剥離し積層する方法、スキャホール・ハイドロゲルを用いた立体培養など様々な取り組みが行われている。その中でも 3D プリンター技術は、各々の細胞を立体的に的確な位置に高速かつ微細に配置できることから、細胞の立体造形技術として注目されている。その方法として、ディスペンサー方式、インクジェット方式、レーザーによる細胞転写方式、およびこれらを複合した技術が開発されており、細胞や足場材料の造形に使用されている。NTN はこれまでに、液晶ディスプレイに用いるカラーフィルタの欠陥修正用として塗布ピン方式による微細塗布装置（Fig. 1）を開発してきた。この装置は高粘度材料を高い位置精度で微細に塗布できることから、3D バイオプリンターへの展開が期待される。本研究では、本装置を用いてゲル化剤を含む細胞懸濁液の定点配置により組織チップを作製し、新たなバイオプリンターとしての適応性について検討した。

【結果・考察】
微細塗布装置を用いて線維芽細胞を塗布した結果、塗布前後で細胞の生存率に大きな変化は見られず、数日後には細胞が基板に接着し増殖している様子が確認された。また、フィブリンゲル（フィブリノゲン、トロンビン）をハイドロゲルとして用い、iPS 細胞から分化させた心筋細胞（hiPS-CM）を塗布したところ、数日後に拍動が確認された(塗布径：約 300 μm)。従来の微細塗布装置は、1 本のピンでフィブリノゲンを含む細胞分散液のみを塗布する 1 ピン方式であったが、トロンビンも塗布可能な 2 ピン方式を新たに開発し､2 液を塗布する場合のそれぞれの量や位置、時間間隔を自由に設定可能にした。また、これまでの塗布ピンでは深いウェルの底面には塗布できなかったが、塗布ピンの長さや塗布機構を改良して、細胞培養用マイクロプレートへの細胞塗布を可能にした。今回は微細塗布装置を用いて、hiPS-CM を塗布する際に添加するゲル化剤に関する検討結果を報告する。

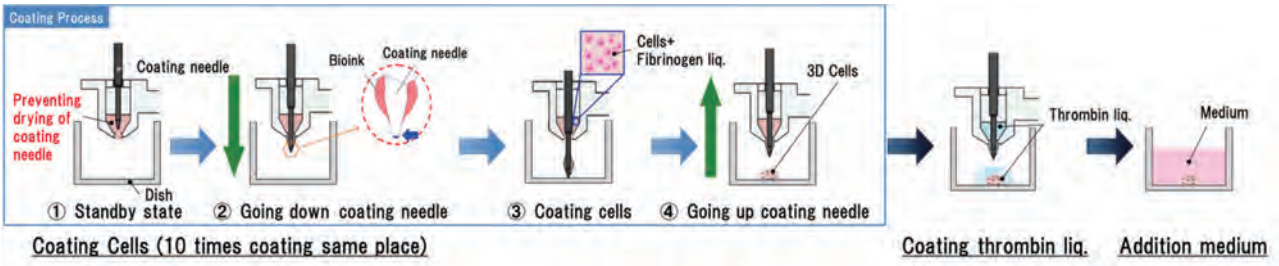


Fig. 1: Process of cell coating in microwell using Microscopic Coating Applicator by coating needle.

Construction of cardiomyocyte tissue chips using Microscopic Coating Applicator by coating needle

Shohei CHIKAE[1, 2], Akihiro YAMANAKA[1], Atsushi ODA[1, 2], Haruka NAKAMURA[1], Takami AKAGI[2], Mitsuru AKASHI[2]
[1]NTN Corporation, [2]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University
E-mail: shouhei_chikae@ntn.co.jp

2P-067

アルギン酸コンポジットを用いた三次元組織培養基材の開発

[1] 上智大学大学院　理工学研究科
○佐々木　寧音[1]，伊澤　惠子[1]，神澤　信行[1]

【緒言】Beta-tricalcium phosphate (β-TCP)は生体親和性を持ち、骨修復基材などの医療用デバイスの材料として注目されている。これまで当研究室では、繊維状β-TCP と carbon beads が焼結してできるポアから成り、生体骨に近い構造をもつ骨代替材料(β-TCP-fiber scaffold; βTFS)の開発を行ってきた。しかし、繊維状β-TCP は強度が低く、培養において溶解度の制御と強度の維持が課題となっている。そこで本研究では、食品添加物のゲル化剤などに利用される天然多糖類であるアルギン酸ナトリウムを用いて、βTFS の強度を高めた培養基材βTFS-Alg の作製方法を検討した。アルギン酸ナトリウムの細胞接着性は低い一方、β-TCP の生体親和性は高いことが分かっている。そこでβTFS にアルギン酸ナトリウムを浸透させ、ゲル化による繊維の補強を考えた。β-TCP から溶出した Ca^{2+}とアルギン酸が反応し、scaffold の一部にアルギン酸ゲルが生成することが考えられる。この生体親和性の異なる 2 材料を組み合せることにより、βTFS の強度を補強するのに加えて、ポア構造により細胞が生育しやすい環境を整え、細胞接着性を向上させた新規の足場材料になることが期待できる。今回βTFS-Alg の作製方法を確立し、細胞増殖性をはじめとする評価を行った。発表では、コンポジット材の詳細な解析結果を報告する。

【実験】はじめに、使用するアルギン酸ナトリウムがマウス由来骨芽細胞様樹立細胞株 MC3T3-E1 細胞に与える毒性を細胞増殖率により評価した。濃度 0.25-2% (*w/v*)のアルギン酸ナトリウムをβTFS に十分量浸透させることで作製したβTFS-Alg に対して、SEM による構造観察を行い、培養前後での変化を比較した。次に、βTFS-Alg 内で細胞を一定期間培養し、培養後のβTFS-Alg に対して細胞局在および増殖率を蛍光染色により観察した。さらに、βTFS-Alg 上で培養した細胞について、遺伝子発現解析により細胞の骨分化評価を行っている。

【結果と考察】 本研究ではβTFS の強度を補強するためにアルギン酸ナトリウムを用い、様々なコンポジットを作製し評価を行った。その結果、アルギン酸ナトリウムを用いることで、細胞培養に必要な期間において強度を維持することができ、βTFS の脆さを補う新たな足場材料を作製することができた。直径張力強度を測定した結果、添加するアルギン酸濃度が高いほど高い強度が得られることが分かった。SEM での構造観察では、細胞が侵入・接着・増殖するために必要なポア構造と繊維の絡み合いに加えて、アルギン酸によるものと思われる膜状構造が観察された。細胞毒性評価の結果、アルギン酸ナトリウムの濃度や粘性によって増殖率に差があり、βTFS-Alg 内での増殖に影響を与える可能性が示された。蛍光染色では細胞はβ-TCP 繊維上やポアの外周で観察され、日を追うごとに細胞数が増えていく様子が見られた。このことから、アルギン酸ゲル自体には細胞は接着しないが、細胞との親和性の高いβ-TCP を原料としたβTFS との組み合せにより、scaffold 内で細胞の生育に適切なポア環境を整えることができたと考えられる。遺伝子発現解析より、βTFS-Alg 内で細胞が骨分化していることを示すことができれば、組織培養基材としての展開も可能であると考えている。以上の結果より、三次元細胞培養の足場材料に対し、アルギン酸ナトリウムをコンポジットとして用いる本研究は新規であり、三次元組織培養に向けた足場材料開発の新たな可能性が広がった。

Mechanical and biological properties of alginate-coated beta-tricalcium phosphate-fiber scaffold.

Nene Sasaki[1], Keiko Izawa[1] and Nobuyuki Kanzawa[1]
[1]Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University, 7-1, Kioi-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8554, Japan
Tel: +81-3-3238-3363, Fax: +81-3-3238-3361, E-mail: ne.on_909@eagle.sophia.ac.jp

2P-068

細胞構造体の凍結保存を可能にする両性電解質高分子を用いたガラス化液の開発

[1] 北陸先端科学技術大学院大学　マテリアルサイエンス，[2] 澁谷工業株式会社
○畠山　翔[1]，寺井　渉[2]，上田　浩司[2]，松村　和明[1]

【緒言】

近年、再生医療分野において幹細胞から分化させた細胞を人体に移植することで、欠損した身体部位や重篤な疾患に犯された臓器を補填することができると期待されている。これを実現するにあたって、細胞や組織の輸送や貯蔵が必要不可欠であり、細胞および組織を長期的に保存するために凍結保存技術の確立が求められている。二次元、三次元の高次細胞構造体を凍結保存する場合、高い生存率の維持が課題となっている。細胞を凍結保存するにあたって、氷結晶が成長すると細胞膜が損傷し、細胞死に至る恐れがある。氷結晶の成長を抑制するために、細胞懸濁液を急速に凍結することで細胞内外の水をアモルファス状態で固化させるガラス化凍結法が用いられる。ガラス化を安定させるために、ガラス化液成分としてエチレングリコール(EG)やジメチルスルホキシド(DMSO)などが用いられる。それらは高濃度で使用すればするほど、氷結晶の成長抑制能が高くなるが、同時に細胞への毒性も高くなる。他にも細胞の分化への影響や浸透圧毒性が懸念される。本研究室では新規ガラス化液成分として氷結晶を抑制しつつ分化への影響が少ないという特徴を持つ両性電解質高分子を用いた[1]。これを用いることで従来のガラス化液成分の濃度を下げることが可能となり、凍結した際の高次細胞構造体の生存率が向上すると考えられる。

【実験】

ガラス化安定効果のある両性電解質高分子は、2 種類作製した。ポリリジン 25%溶液(PLL)と無水コハク酸(SA)または無水ジメチルグリコール酸(DMGA)を 70℃で 1 時間攪拌することでコハク酸導入ポリリジン(SA-PLL)およびジメチルグリコール酸導入ポリリジン(DMGA-PLL)を合成した。合成したポリマーとエチレングリコール(EG)、スクロース(Su)、フィコール(Fi)を混合しガラス化液を作製した。作製したガラス化液を用いて、ヒト間葉系幹細胞スフェロイドを-150℃で冷却し、ガラス化させた後、37℃の培地で急速に解凍した。トリパンブルー染色と細胞融合によって生存率を評価した。示差走査熱量計(DSC)を用いて、10℃/min で室温から-170℃まで温度降下および再度室温まで昇温したときのガラス化液のガラス転移点および結晶化/再結晶化の有無を測定した。

【結果と考察】

DSC を用いてガラス化液の結晶化/再結晶化の有無を確認した。EG 6.0M, Su 0.5M,Fi 12.5%の溶液およびそれに SA-PLL を 10%添加した溶液では昇温時に結晶化が見られた。しかし、EG の濃度を 6.5M としたときには結晶化は見られなかった。一方で EG 6.0M, Su 0.5M,Fi 12.5%の溶液に DMGA-PLL を 10%添加した溶液(Fig.1)では、結晶化は見られず、より高いガラス状態の安定性が確認された。これらの溶液と既存のガラス化液の DAP213 についてスフェロイドの融合評価を行った。DAP213 のスフェロイドは融合せずに well 内で浮遊していたため細胞は死滅したと考えられる。高分子を用いた溶液でガラス化させたスフェロイドは融合していたため細胞は生きていると考えられる。

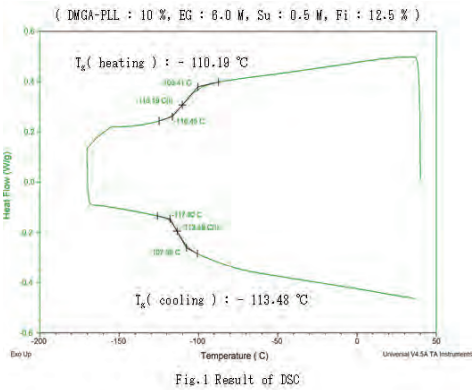


Fig.1 Result of DSC

【参考文献】

[1]Matsumura K., et al., ACS Biomater Sci Eng, 2, 1023-1029,(2016)

Development of vitrification solution with polyampholytes which enables cryopreservation of tissue-cell constructs.

Sho Hatakeyama[1], Wataru Terai[2], Hiroshi Ueda[2], Kazuaki Matsumura[1]
[1]School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology　[2]Regen. Med. Manufact. Sys. Div Shibuya Corp.　[1]Tel: +81-7-6151-1680, E-mail: mkazuaki@jaist.ac.jp

2P-069

無血清培養用の完全合成足場の開発とその細胞選択接着性

AGC 株式会社　商品開発研究所
○朱　麗君，山本　今日子

【緒言】再生医療や創薬分野で細胞を利用するためには、“数”と“細胞純度”が重要である。近年、均質な細胞を安定して大量調製する組織工学的視点からのアプローチによる培養または評価用部材開発が進んでいる。そのうちの一つは細胞接着活性を有する培養足場であり、接着性細胞である多能性幹細胞と幹細胞由来の組織細胞を培養するために必要とされている。現在、ウシ胎仔血清含有培養液、フィーダー細胞、異種動物由来の細胞外マトリックスタンパク質などを使用し足場を確保しているのが一般的であるが、このような生物由来物質はバッチ変異、免疫応答及び生物由来特融の冷蔵保存期間の制限を受けやすい問題がある。合成培養基質を無血清培地とともに用いればこれらの問題の回避が期待でき、再生医療分野での“安全性”も担保できる。

しかしながら生物由来の接着足場の多くはどんな細胞でも接着させてしまい、再生医療において求められる“細胞の純度”というニーズを満たすのは非常に難しい。本研究では、無血清培地で特定の細胞の接着を促進させる接着足場の開発を行い、細胞またはタンパク質との相互作用を起こす様々な完全合成ポリマーの細胞接着性を評価した。

【実験】溶液重合によって得られた人工合成ポリマーをガラス基板上にスピンコーティングしてポリマー膜を作製した。リファレンスとしてRGDペプチドを含有する接着足場を使用した。作製した表面にヒトiPS細胞、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）、ヒトiPS細胞由来心筋細胞（CMs）をそれぞれ播種し、血清含有または無血清培地で数時間培養した後に細胞を撮影し、CCK-8キットを用いて接着している細胞数を計算した。さらに細胞画像解析により細胞接着に関する特徴値の比較を行った。また、表面特性と細胞接着性との相関性を検証するために、ポリマー膜の各種表面物性を評価した。

【結果と考察】血清含有と無血清培地でポリマー足場へ接着している細胞数を比較すると、血清含有培地のポリマー表面の接着細胞数は無血清条件より多く、血清の有無によって細胞接着の機構が異なることを確認した。

無血清条件では、一部のポリマーで優れた細胞接着能を有するものがあった。細胞接着挙動を観察したところ、RGDペプチド含有リファレンスには3種類の細胞ともよく伸展し接着していたが、ポリマーAではhMSCのみ、ポリマーBではCMsのみよく接着していることがわかった（Fig.1）。ポリマーAおよびBは室温保管が可能であり、リファレンスと比較して貯蔵安定性にも優れている。

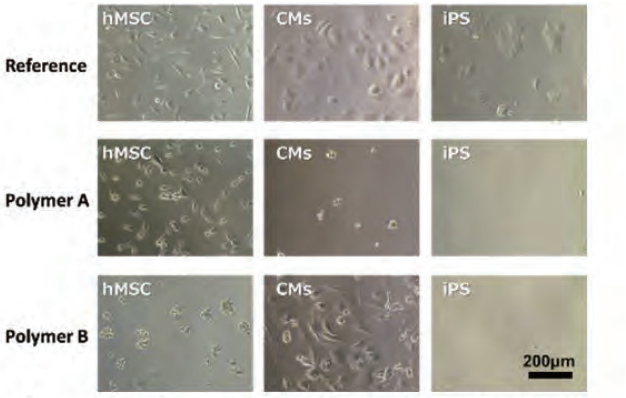


Figure 1 Adhesion of hMSC, CMs and iPS cells onto reference and polymer substrates. The cells were cultured for 4 hours.

これらの結果から選択的に特定の細胞を接着させるポリマー設計が可能であり、無血清培養条件において完全合成足場として利用できると考えられる。均質な細胞の安定調製に有用である可能性が見出された。

Screening of cell-selective adhesion synthetic substrates for serum-free culture

Lijun Zhu, Kyoko Yamamoto
AGC Inc. New Product R&D Center
Tel: +81-45-374-7893, Fax: +81-45-374-8731, E-mail: lijun.zhu@agc.com

2P-070

脂肪再生可能な吸収性埋入材料の検討

[1]京都大学医学研究科形成外科，[2]関西医科大学形成外科，[3]グンゼ株式会社 QOL 研究所
○荻野　秀一[1]，森本　尚樹[2]，山中　浩気[1]，坂本　道治[1]，坂元　悠紀[3]

【緒言】外傷後、腫瘍切除後、先天性疾患による変形を持つ患者さんにとって、軟部組織欠損を再建することは重要である。乳癌患者数の増加とともに、乳房再建の需要が高まっている。現在、乳房再建は、シリコンインプラントなどの人工物埋植、腹部や背部などからの自家組織移植、脂肪移植などが行われているが、人工物による合併症、自家組織の犠牲、脂肪生着不良など各々に問題がある。一方、細胞、細胞成長因子、足場材料を併用することで脂肪再生が可能であるが、乳癌術後の再建では細胞や細胞成長因子使用の安全性は確立されていない。我々は、非吸収性のポリプロピレンをメッシュ状の外殻としコラーゲンスポンジ(CS)封入することで内腔を維持すれば、細胞や細胞成長因子を用いなくても生体内で脂肪が形成されることを、白色家兎を用い明らかにした。その上で、後日抜去の必要のなり吸収性材料であるポリ L 乳酸(PLLA)をメッシュ状の外殻とし CS 封入することで生体内に脂肪が形成されることを、ラットを用いた検討で明らかにした。今回、埋入後 2 年までの結果を観察するため、白色家兎を用い PLLA を用いた埋入材料で更に脂肪再生について検討した。

【実験】PLLA 糸から作製したラグビーボール型の PLLA mesh に CS を封入した CS 封入 mesh implant(長径 30mm 短径 20mm)と、PLLA sheet から作製した PLLA cup(1mm の小孔を多数持つ cup 状外殻:長径 30mm 短径 20mm) に CS 封入する、しない 2 群の implant を作成した。白色家兎鼡径部に以下の処置を行った。手術処置を行わない control 群、切開し implant を埋入せず創閉鎖した sham-operation 群、3 種類の implant をそれぞれ埋入した CS 封入 mesh 群、CS なし cup 群、CS 封入 cup 群の 5 群(N=5)を作成し、白色家兎鼡径部皮下脂肪形成を比較した。埋入 12、24 か月後に組織採取し、脂肪重量、体積、埋入物内腔の組織断面積、脂肪組織断面積を比較した。

【結果と考察】重量、体積は、12 か月で CS 封入 cup 群が重量、体積ともに control 群と sham-operation 群より大きかった。(P＜0.01) CS なし cup 群も重量、体積ともに control 群と sham-operation 群より大きかった。(重量:共に P＜0.01、体積:各々P＜0.01、P＜0.05) 24 か月では、重量、体積ともに CS 封入 mesh 群が control 群、sham-operation 群（各々P＜0.01、P＜0.05）より大きかった。埋入物内腔の組織、脂肪組織断面積では、12、24 か月ともに、CS 封入 mesh 群、cup2 群の 3 群間に有意差を認めなかった。cup、mesh implant はともに埋入後 12 か月で内腔に脂肪が再生された。24 か月で、CS 封入 mesh が採取組織の重量・体積が最も大きく、mesh 内腔に脂肪を確認できた。以上より、mesh 形態の PLLA の外殻に CS を封入した形態が最も脂肪形成に有用な材料であると考えられた。今後、より大きな脂肪再生を得るため豚などの大型動物を用い検討を行う予定である。

Development of a bioabsorbable implant to enable the regeneration of adipose tissue *in vivo*

Shuichi Ogino[1], Naoki Morimoto[2], Hiroki Yamanaka[1], Michiharu Sakamoto[1], Yuki Sakamoto[3]
[1]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University
[2]Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University
[3]Gunze QOL Research Center Laboratory
Tel: +81 75 751 3613, Fax: +81 75 751 4340, E-mail: m00w0183@kuhp.kyoto-u.ac.jp

2P-071

アテロコラーゲン膜セルカルチャーインサートの特性評価

株式会社　高研　研究所
○東　大樹，勢村　加容子，藤本　一朗

【緒言】
新たな細胞培養の研究分野において、細胞外マトリクス（ECM）の機能を模倣し、生体内環境を再現できる細胞培養材料が求められている。その中でコラーゲンは ECM の主成分で、生体適合性、生分解性に優れたバイオマテリアルである。特にアテロコラーゲンはコラーゲンのテロペプチド部位を除去して抗原性を低減し安全性を高めた物質である。また近年、培養器具としてポリカーボネート製セルカルチャーインサートを用いることにより、膜を通した細胞間相互作用やホルモン・成長因子等の分子の薬物輸送研究も進んできた。そこで今回、我々はこのアテロコラーゲンを線維化し膜状に加工したコラーゲン膜のセルカルチャーインサートを作製し、その膜の形態、物質透過性を評価したので報告する。

【実験】
アテロコラーゲン酸性溶液とリン酸緩衝生理食塩水を混合して調製したコラーゲン中性溶液を成型容器に流し込み、線維化工程、乾燥工程、架橋工程、脱塩・脱水工程、乾燥工程にて線維化コラーゲン膜を得た。作製した膜の表面構造を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した。線維化コラーゲン膜をセルカルチャーインサートのフレームに固定し、膜の物質透過性するため、膜上部から評価物質（FITC-Dextran : 4～70 kDa、BSA : 70 kDa、IgG : 155 kDa、Thyroglobulin : 660 kDa）を加え、任意の時間、37℃でインキュベート後、膜下部より検出される評価物質の濃度から透過率を算出した。

【結果と考察】
作製した線維化コラーゲン膜は、SEM による形態観察で、およそ φ 0.05～1.0 μm のコラーゲン線維がランダムに配向した構造であり、隣接する線維間には隙間があることを確認した。そして、透過性試験の結果より、各評価物質を膜上部に加えてから 48 時間後の透過率は、FITC-Dextran（4～70 kDa）では 70%以上、BSA（70 kDa）、IgG（155 kDa）、および今回の検討で最大の分子サイズである Thyroglobulin（660 kDa）のいずれにおいても 70%以上を示した。作製した線維化コラーゲン膜のセルカルチャーインサートは、ホルモンなどの高分子でも膜透過性が高く、細胞間相互作用の解析に有利な細胞培養材料であることが期待される。また、この膜は他の物質を混合することなく生体適合性の高いアテロコラーゲンのみで構成している特徴をもつため、生体移植への使用にも期待ができる。細胞を用いた実験を実施し、合わせて報告する。

Characterization of atelocollagen membrane cell culture inserts

Daiki Higashi, Kayoko Semura, Ichiro Fujimoto
KOKEN Research Center, KOKEN Co. Ltd., Tokyo, Japan.
Tel: 03-5914-2540, Fax: 03-5914-2670, E-mail: daiki.higashi@kokenmpc.co.jp

2P-072

電気・引張変形刺激を複合的に印加するための導電性高分子を用いた柔軟な細胞培養基材

[1] 慶應義塾大学 理工学部機械工学科，[2] 慶應義塾大学 大学院理工学研究科
○宮田 昌悟[1]，志楽 英之[2]

【緒言】
神経細胞の一種である運動ニューロンや心筋細胞は，電気的刺激および引張刺激を常に受けながら活動する環境下にあり，身体の動作に必要不可欠な働きを担っている細胞である．これらの細胞の疾患は生命維持に重大な影響を与えることが多い．疾患の機序の解明や治療薬の開発は極めて重要であり，細胞を用いた生体外での疾患モデルや創薬スクリーニングデバイスに関するニーズが高まっている．
そのような背景から本研究では，生体組織工学的手法を用いて，生体外にて生体組織の置かれている環境を模擬して疾患モデルとしたり薬効評価を可能とするデバイスに注目した．特に，引張変形と電気刺激に曝される神経細胞や筋系細胞を対象として，導電性および柔軟性を有する培養基材を開発し，これを用いて神経モデル細胞に電気刺激および引張刺激を印加した．

【実験】
本研究では，導電性高分子でかつ生体適合性を有するポリエチレンジオキシチオフェン(PEDOT)をポリジメチルシロキサン(PDMS)に転写することで，柔軟性を有した PEDOT-PDMS 電極を開発した．さらに同材料を培養基材として，引張刺激と電気刺激を同時に印加可能な培養装置を開発した．
神経モデル細胞としてラット副腎髄質由来褐色細胞種(PC12 細胞)を用いて，ひずみ 1%，周波数 0.5 Hz の繰り返し引張変形と 400 mV/mm，0.5 Hz の電気刺激を複合的に印加して，3 日間培養した．培養された神経モデル細胞の分化率，生存性，神経突起の伸展方向に与える影響を評価した．

【結果と考察】
開発した培養基材上で引張変形，電気刺激を印加しても PC12 細胞は生存性を維持することが認められた．また，細胞の神経突起の伸展状況から神経細胞分化を評価したところ，電気刺激によって分化が促進されることが明らかとなった．さらに，引張変形刺激と電気刺激を複合的に印加することで，神経突起の伸長方向が配向した．
これより，導電性のある柔軟な培養基材を用いることで，電気刺激による神経細胞分化の促進と引張刺激による神経突起の伸長方向の制御が可能であることが示された．

Elastic Cell Culture Substrate Consist of Conductive Polymer for Electric-Tensile Combined Stimuli
Shogo Miyata[1], Hideyuki Shiraku[2]
[1]Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University, [2]Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: +81-45-566-1141, Fax: +81-45-566-1495, E-mail: miyata@mech.keio.ac.jp

2P-073

肝細胞シート組織からの血管新生因子分泌を誘導するための核酸送達

[1]東京女子医科大学　先端生命医科学研究所，[2]梨花女子大学校　薬学部
○小林　純[1]，Hyukjin Lee[2]，大和　雅之[1]，岡野　光夫[1]

【緒言】我々は、温度応答性培養皿を利用して肝細胞シート組織を作製し、*in vitro* での肝培養組織および *in vivo* での異所的肝組織構築に取り組んでいる。移植した肝細胞シート組織が肝臓以外の異所的部位（皮下）に生着すると、血友病やα1アンチトリプシン欠損症など先天的性疾患に対しての凝固因子や酵素の補充療法の効果があることを示してきた。ただし、皮下組織は毛細血管等の血管が発達していないため、移植した肝細胞シートは生着できず、移植数週間後に壊死してしまう。そこで、予め塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放デバイスを皮下移植して毛細血管を誘導させると、移植した肝細胞シート組織はうまく生着する。ただし、bFGF 徐放デバイスおよび肝細胞シートのための移植を少なくとも２回行う必要があり、侵襲的な手法である。そこで本研究では、肝細胞シート自身が血管新生因子を分泌し、血管新生を誘導するための手法を開発する。具体的には、肝細胞シート組織に血管内皮細胞増殖因子（VEGF）をコードしたプラスミド DNA あるいはメッセンジャー RNA をトランスフェクションし、肝細胞シート自身が分泌する VEGF により血管新生誘導および生着することを目指す。ここでは、初代培養肝細胞に対するトランスフェクション効率を評価するため、緑色蛍光タンパク質 GFP をコードしたプラスミド DNA および mRNA を用いた予備検討を報告する。

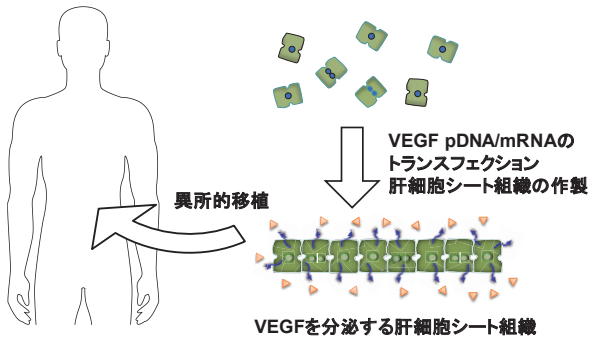


Figure 1　Schematic of ectopic transplantation of hepatocyte sheets secreting VEGF.

【実験】293FT 細胞に対し、Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)をコードしたプラスミド DNA（pcDNA3-EGFP, addgene, #13031)をエレクトロポレーション法により導入した。プラスミド DNA 導入後の 293FT 細胞を培養皿上で 24 時間培養後、WST-1 による細胞生存率を計測し、フローサイトメトリーを用いて EGFP 陽性細胞率を解析した。また、8～12 週齢の雄ラットから採取した初代肝細胞に対してもプラスミド DNA を導入し、コラーゲンコート培養皿上で 24 時間培養後、上述と同様の手法で解析を行った。さらに、プラスミド DNA を線状化し、PCR により EGFP をコードする部分を増幅し、*In vitro transcription* により EGFP mRNA を合成した。市販の Lipofectamine 2000 を利用して、コラーゲンコート培養皿上のラット肝細胞に対して、合成した EGFP mRNA のトランスフェクションを行い、EGFP 陽性細胞率を解析した。

【結果と考察】エレクトロポレーション法による 293FT 細胞への pDNA トランスフェクション条件の最適化を行った結果、約 50%の生存率で、EGFP 陽性率が約 50%を示した。一方、ラット初代肝細胞に対するトランスフェクションを行ったところ、EGFP 陽性率が最大でも約 1%程度であり、きわめて低い導入率であった。つまり、293FT 細胞などの増殖性細胞には高い導入率、初代肝細胞などの非増殖性細胞には低い導入率となった。また、今回用いたプラスミド DNA（pcDNA3-EGFP）の EGFP 発現効率が低いので、より発現効率が高いプロモーター配列を有するプラスミド DNA を用いれば、EGFP 発現効率が向上すると考える。さらに、肝細胞に対する Lipofectamine 2000 による EGFP mRNA トランスフェクションでは、さらに低い EGFP 陽性率であったため、今後の改善が必要である。発表当日は、EGFP 発現効率が高いプラスミド DNA、VEGF をコードしたプラスミド DNA を用いたトランスフェクション結果についても報告する予定である。

Nucleic Acid Delivery to Induce the Secretion of Angiogenic Factors from Hepatocyte Sheets

Jun Kobayashi[1], Hyukjin Lee[1], Masayuki Yamato [1], Teruo Okano [1]
[1]Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University
[2]Collage of Pharmacy, Ewha Womans University
Tel: +81-3-3353-8112x43215, Fax: +81-3-3359-6046, E-mail: kobayashi.jun@twmu.ac.jp

2P-074

N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子を用いた効率的な間葉系幹細胞単離技術の開発

[1] 九州大学先導物質化学研究所, [2] ソマール株式会社, [3] 東京大学生産技術研究所

○伊勢　裕彦[1], 松永　久美子[2], 篠原 満利恵[3], 酒井　康行[3]

【緒言】

現在、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSC)を用いた再生医療研究が盛んに行われており、ラット及びマウス、ヒトなどの骨髄組織や脂肪組織から単離された MSC が研究に用いられている。現在では、研究用の MSC はヒトを初め広く販売されているが、ロット差による分化能のばらつきが大きいことが知られている。このロット差は、MSC 樹立時の培養日数や継代回数に依存していると考えられる。骨髄細胞集団からの MSC の単離では、骨髄細胞を細胞培養用デッシュに播種し、このディッシュに接着し増殖する細胞を MSC として単離している。これらの MSC の細胞培養用ディッシュに対する初期の接着は、非特異的な相互作用に依存しており効率的な接着が実現できていない可能性が考えられる。このため、十分な細胞数を得るための長期培養が必要となり、その培養条件によって品質が大きく左右されることが予想される。

本研究では、MSC に発現する細胞骨格分子ビメンチンに着目し、このビメンチンの発現を指標に効率的な MSC の単離を検討する。骨髄細胞集団中には、骨髄球、赤血球、赤芽球、好酸球、造血幹細胞、間質細胞（MSC を含む）が存在している。これらの細胞種の中で、ビメンチンを発現する細胞は MSC を含む間質細胞であるため、ビメンチンを指標にすれば、効率的な MSC の濃縮が期待できる。我々は、これまでにビメンチンが細胞膜表面上に出現して N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)糖鎖高分子と結合することを報告してきた。そこで、この GlcNAc 糖鎖高分子をコーティングした細胞培養用ディッシュを作製し、骨髄細胞集団中の MSC が、これらのディッシュに選択的に接着し増殖するか検証し、MSC の効率的な単離の実現を検討した。

【実験】

アクリル酸を主鎖とする GlcNAc 糖鎖高分子(AC-GlcNAc)を作製し、細胞培養用ディッシュにコーティングを行った。これらのコーティングについて、GlcNAc 特異的レクチンであるサクシニル化 WGA によって確認した。そして、AC-GlcNAc コーティングディッシュに対して不死化ヒト MSC を播種し、AC-GlcNAc を介した接着を確認した。次にラット骨髄細胞を AC-GlcNAc コーティングディッシュに播種し培養することで MSC のコロニー形成をクリスタルバイオレットで検討した。

【結果と考察】

AC-GlcNAc の細胞培養用ディッシュに対するコーティングを検討したところ、AC-GlcNAc が安定にコーティングされることが示された。また不死化ヒト MSC を用いて AC-GlcNAc コーティングディッシュへの接着を検討したところ、ビメンチンを siRNA でノックダウンした MSC の AC-GlcNAc への接着が低下したことから、MSC の細胞表面上のビメンチンを介した AC-GlcNAc の接着が示された。ラット骨髄細胞を AC-GlcNAc コーティングディッシュに播種し 17 日間培養したところ、通常の細胞培養用ディッシュでは、ディッシュ全体面積の 10%程度のコロニー形成であったが、AC-GlcNAc では、30～40%程度のコロニー形成率であった。また増殖した細胞は、CD106 及び CD90 陽性、CD11b 陰性であり、脂肪分化及び骨分化の検討では、Oil-red O 及び alizarin red 染色が観察され分化能が確認された。従って AC-GlcNAc コーティングディッシュ上のコロニーは MSC であることが確認された。以上のことから、AC-GlcNAc コーティングディッシュによる効率的な MSC の単離が期待された。

Development of effective isolation system for mesenchymal stem cells by using GlcNAc-bearing polymers

Hirohiko Ise [1], Kumiko Matsunaga[2], Marie Shinohara[3], Yasuyuki Sakai[3]

[1] Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, [2] Somar Corp., [3]Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

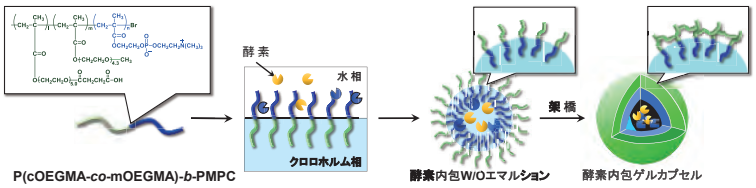
Tel: +81-92-802-2503, Fax: +81-92-802-2509, E-mail: ise@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

2P-075

診断応用への展開を志向した水溶性物質を内包可能なゲルカプセルの調製

[1] 関西大学化学生命工学部，[2] 関西大学 ORDIST
○平林　利香 [1]，河村　暁文 [1,2]，宮田　隆志 [1,2]

【緒　言】細胞内では酵素が高濃度に存在し，酵素反応の生成物が次の酵素反応へとドミノ型に進行する酵素カスケード反応が生じる。生物は，この酵素カスケード反応により高効率で代謝反応を進行させている。また，診断分野においても複数の連続した酵素反応が利用されている。しかし，効率よく反応を進行させるためには，高濃度の酵素を用いて複数の酵素を近接させる必要があり，多量の酵素を用いることが課題であった。そこで，われわれは内水相に水溶性物質を高効率で内包可能な Water-in-Oil（W/O）エマルションに着目した。本研究では，高効率で酵素を内包可能なゲルカプセルの調製を目的として，カルボキシ基を有する carboxy oligo(ethylene glycol) methacrylate（cOEGMA）と methoxy oligo(ethylene glycol) methacrylate（mOEGMA）との共重合体（P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)）と poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)（PMPC）とからなるブロック共重合体 P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)-*b*-PMPC を合成し，W/O エマルションの形成について検討した。さらに，エマルション外層を架橋することにより，水相にも分散可能な酵素内包ゲルカプセルの調製を試みた（Scheme 1）。



Scheme 1. Schematic illustration for preparation of enzyme encapsulated gel capsules.

【実　験】cOEGMA と mOEGMA，2-hydroxyethyl 2-bromoisobutyrate，tris[2-(dimethyl amino)ethyl] amine および CuBr とを用い，単電子移動リビングラジカル重合により P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)を合成した。続いて，重合終了後の先の反応系に MPC を加えて重合することにより，P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)-*b*-PMPC を合成した。この P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)-*b*-PMPC をリン酸生理食塩水（PBS(-)）/クロロホルム混合溶媒中に添加して超音波照射し，エマルションを形成させた後，エマルション外層を 1,4-butanediamine で架橋してゲルカプセルを調製した。ゲルカプセルの粒径は，動的光散乱（DLS）法により求めた。

【結果と考察】得られた P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)-*b*-PMPC は，PBS(-) / クロロホルム混合溶媒中で PMPC ブロックが水相に，P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)ブロックがクロロホルム相に分配されることで乳化剤として作用し，粒径約 260 nm の W/O エマルションを形成することがわかった。次に，1, 4-butanediamine を用いてエマルション外層のカルボキシ基を架橋した。反応後，連続相をクロロホルムから水に置換して DLS 測定を行ったところ，単峰性の粒径分布を有する約 260 nm のゲルカプセルが生成したことがわかった（Fig. 1）。したがって，PBS(-) / クロロホルム混合溶媒中において形成された W/O エマルションの界面を安定化している P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)-*b*-PMPC のカルボキシ基間をジアミンによって架橋することにより，P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)-*b*-PMPC が溶解する水中においても安定に分散可能なゲルカプセルが得られることがわかった。

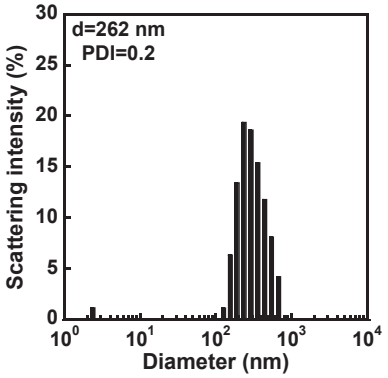


Fig. 1. Size distribution of gel capsules prepared by crosslinking of P(cOEGMA-*co*-mOEGMA)-*b*-PMPC emulsifier using 1, 4-butanediamine.

Preparation of Gel Capsules That Act as an Enzymatic Cascade Reaction Field for Diagnostic Systems

Rika Hirabayashi[1], Akifumi Kawamura[1,2], Takashi Miyata[1,2]
[1]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering and [2]ORDIST, Kansai University
Tel: +81-6-6368-1978, Fax: +81-6-6330-3770, E-mail: akifumi@kansai-u.ac.jp

2P-076

におい分子の揮発を制御する多糖超薄膜の創製と機能評価

[1] 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻，[2] 東海大学工学部応用化学科，[3] 東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター
○土屋 笙子[1]，松本 拓也[2]，中川 篤[3]，岡村 陽介[1-3]

【緒言】近年、消臭・芳香機能を特徴にした香粧品が市場で多く出回っている。しかし、におい成分は高揮発性である他、汗などで有効成分が流れてしまうため効果の持続性が課題となっている。他方、我々は、高分子を薄膜状に加工した高分子超薄膜(ナノシート、膜厚 100 nm 以下)が、ナノ厚特有の高い接着性を発現し、物理吸着のみで様々な界面に貼付可能であることを見出している [1)]。本研究では、生体適合性を有しアミノ基や水酸基を豊富にもつ多糖類の一つであるキトサンからなるナノシートに、におい分子を包接するためのシクロデキストリン(CD)を化学結合させた「貼る消臭剤・芳香剤」の創製することを目的とした。

【実験】セルロースアセテート溶液(CA, 40 mg/mL in 1,4-dioxane)を SiO_2 基板(2×2 cm)上にスピンコート法で成膜(4,000 rpm, 20 s)し、犠牲膜とした。次いで、キトサン溶液(CS, 10 mg/mL in 2% AcOHaq.)を同じくスピンコート法で成膜(6,000 rpm, 60 s)し、CS ナノシートを調製した。Methylene diphenyl diisocyanate(MDI)とβ-CD あるいはγ-CD 混合溶液(15 mM, 3.8 mM in DMF, 0.5 mL)に、触媒として triethyl amine(2.5 mM)を添加し、CS ナノシート上にキャスト後、加熱(70℃, 1 h)した。DMF にて洗浄後、アセトン中で犠牲膜である CA 層を溶解させ、CD 担持 CS ナノシート(CD-CS ナノシート)を得た。

調製した CD-CS ナノシートをにおい分子である Linalool(0.2 mL)と共に密閉ビン(容量 350 mL)中に入れ、静置した(r.t., 15 h)。その後、ナノシート上に吸着した Linalool を Acetone(1 mL)で溶解・回収し、ガスクロマトグラフィー分析に供し、Linalool 吸着量を定量した。また、ポリエチレン基板(PE, φ10 mm)上に貼付した CD-CS ナノシート上に Linalool 溶液(30% in Ethanol)を 10 μL 滴下後、気体捕集ポンプを用いて経時的に揮発した Linalool を回収し、揮発挙動を解析した。

【結果と考察】CA 犠牲層の上に CS 溶液を成膜し、MDI を介して CD を反応させた。アセトン中で CA 層を溶解・除去したところ、SiO_2 基板の形状を維持したままナノシートを回収することに成功した。皮膚に貼付することも可能であり、目立たず装着感すらないことも特筆すべき点であった。CD-CS ナノシート単位面積当たりの Linalool 吸着量は、CD 未担持体の 4 倍以上と高値を示しており、ナノシート上に表面修飾された CD によって Linalool が包接されたことを示唆した。そこで、皮膚貼付を想定してナノシートを基板上に貼付し、30% Linalool 溶液を滴下したあとの気相中の Linalool 濃度を経時的に定量した。その結果、MDI 架橋した CS ナノシートを貼付することにより、Linalool の揮発速度は低下した。また、CD を担持させることでその効果は顕著に発現し、長時間持続していた。以上より、架橋剤を介して CD を CS ナノシート上に表面修飾することにより、におい分子の揮発を抑制しつつ長時間芳香させる技術を確立した。

【参考文献】1) Y. Okamura *et al. Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4388-4392.

Fabrication and evaluation of polysaccharide ultra-thin films for controlled release of odor molecules

Shoko Tsuchiya[1], Takuya Matsumoto[2], Atsushi Nakagawa[3], Yosuke Okamura[1-3]
[1]Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University
[2]Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University
[3]Micro/Nano Technology Center, Tokai University
[1]Tel: 0463-58-1211 (Ex.4692), FAX: 0463-50-2426, E-mail: aromarose.328@gmail.com, y.okamura@tokai-u.jp

2P-077

pH Sensor via Tunable G-quadruplex Structure on Gold Nanoparticle Surface

[1]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [2]RIKEN Cluster for Pioneering Research
○Surachada Chuaychob[1,2], Masahiro Fujita[2], and Mizuo Maeda[1,2]

【Introduction】

The hydrogen ion exponent, pH, has a vital role in human body that is strongly effect to cell ability. The pH is a scale from 0 to 14, with 7 being neutral. The human blood pH, however, varies in a very narrow range around 7.35~7.45. Below or above this range means symptoms and disease. If the blood pH moves to much below 6.8 or above 7.8, the cells stop functioning and the patient dies. So, a noninvasive pH screening of human fluid, especially blood, is necessary to be a clue for early stage of symptoms and disease diagnosis. In this study, we would like to develop a real-time pH sensor for an alternative non-invasive screening test using G-quadruplex DNA-conjugated gold nanoparticles for quantitative and qualitative analysis.

【Experiment】

G-quadruplex DNA (G4) was functionalized onto the surface of gold nanoparticle (AuNP). In this work, thrombin aptamer (TBA) is a candidate for G4 strand due to its pH-sensitive property. Before the immobilization of TBA on AuNPs (TBA-AuNPs), TBA was modified with linker bases and connected to poly-adenine (polyA) as a pH sensor. Then the concentration and length of complementary strand, the length of linker between poly-A and TBA, reaction time, and salt ($NaNO_3$) concentration were optimized. The degree of particle aggregation was monitored using the ratio between the absorbances at 590 nm (aggregated particles) and at 529 nm (dispersed particles). The higher ratio thus indicates the higher degree of aggregation.

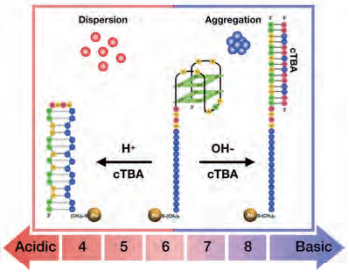


Figure 1. Schematic drawing of a modified TBA on AuNPs. At lower pH, the TBA is deformed to a loose loop structure.. The particles remained despersed, showing a red color solution. At higher pH, the TBA unfolds and then hybridizes with cTBA, leading to a rigid inter-strand duplex, providing an particle aggregation with purple-blue color solution.

【Results and Discussion】

In acidic conditions, TBA-AuNPs were dispersed (red color solution) even if the complementary strands of TBA (cTBA) was added. On the other hand, a non-crosslinking aggregation of TBA-AuNPs in basic solution (the purple-blue solution) occured. This is due to the difference of DNA structure. As shown in Fig. 1, the formation of rigid duplex by inter-strand hybridization with cTBA, leading to the non-crosslinking aggregation, while a loose loop structure because of the intra-strand hybridization of DNA was formed in acidic conditions.

After optimizing some parameters i.e. a number of linker bases, salt (NaNO3) concentration, and reaction time, the degree of aggregation was significantly different between acidic and basic solutions with 1.0 OD of TBA-AuNPs in 0.1 M Na^+ phosphate buffer containing 0.25 M $NaNO_3$ within 10 minutes. Obviously, the solution color changes easily form red to blue with number of linker more than 2, 3 and 4 bases (i.e. TC, TTC, TCTC). The more basic solution the larger degree of colorimetric change was shown. Then the length and concentration of complementary strands would have evaluated further and it is expected pH-dependent aggregation would be drastically increased due to the huge change in DNA rigidity from G4 to duplex and the intrinsic hybridization affinity. TBA-AuNPs show a good feasibility and sensing property for pH detection based on a non-crosslinking behavior. Under an optimum condition, we expect that this sensor can possibly apply to use as a non-invasive tool for symptoms and diseases primary screening, i.e. blood pH test, in near future.

---

pH Sensor via Tunable G-quadruplex Structure on Gold Nanoparticle Surface
Surachada Chuaychob[1,2], Masahiro Fujita[2], and Mizuo Maeda[1,2]
[1]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo [2] RIKEN Cluster for Pioneering Research
Tel: +81-48-467-9312, Fax: +81-48-462-4658, E-mail: mfujita@riken.jp and mizuo@riken.jp

2P-078

タンパク質高感度検出を可能とする分子インプリント蛍光ナノセンサ

[1] 神戸大学大学院工学研究科
○水川　裕貴[1]，堤　克輝[1]，北山　雄己哉[1]，竹内　俊文[1]

【緒言】

特定のタンパク質を高感度かつ特異的に検出可能な材料は、疾患の早期発見や経過観察において重要な役割を果たすことから高い注目を集めている。分子インプリントポリマー（MIPs）は、標的分子に対する認識空間を高分子マトリクス中にもつ人工分子認識材料であり、近年では抗体に匹敵する感度と選択性で標的分子を認識することが可能となりつつある。そのような中、当研究室では生体内で生じるタンパク質の翻訳後修飾に倣い、分子インプリンティングによる認識空間を構築後、後天的に部位特異的修飾を施すポストインプリンティング修飾（PIM）を独自に開発した[1)]。その結果、MIPs への機能変換・機能付与を達成し、これまで様々な標的分子を高感度に検出可能な MIP 薄膜の構築に成功している。

本研究では、分子インプリンティングおよび PIM を用いた標的タンパク質を高感度かつ特異的に認識可能な分子インプリント蛍光ナノセンサの開発を試みた。モデル標的タンパク質として選択したヒト血清アルブミン（HSA）を用い、PIM 用鋳型タンパク質を設計・合成し、この鋳型タンパク質を用いた MIP ナノゲル（MIP-NGs）を合成した。さらに、得られた MIP-NGs に対して PIM により蛍光分子を導入することで、標的タンパク質の結合情報を蛍光挙動の変化として検出することが可能な MIP ナノセンサを構築した。

【実験】

ヒト血清アルブミン（HSA）に 2-iminothiolane(2-IT) を 4℃で 1 時間反応させてチオール基修飾 HSA を得た。さらに、チオール基修飾 HSA を methacryloylethyl pyridyldisulfide と反応させることで HSA にジスルフィド基を介してメタクリロイル基を修飾した。チオール基およびメタクリロイル基の導入数を、MALDI-TOF-MS を用いて定量した。メタクリロイル基修飾 HSA、pyrrolidyl acrylate (PyA)、*N*-isopropylacrylamide (NIPAm)、2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC)、*N,N'*-methylenbisacrylamide (MBAA)、2-2'-azobis(2-methyl propionamide) dihydrochloride (V-50) を 10 mM phosphate buffered saline pH 7.4 (140 mM NaCl : PBS) 中で、70℃で 12 時間、無乳化剤沈殿重合を行うことで MIP-NGs を作製した。次に N-Hydroxysuccinimide 修飾を施したシリカ粒子で未反応のメタクリロイル基修飾 HSA および HSA を結合しているナノゲルを捕捉し、その他の未反応物や不純物を除去した。その後、tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride を添加してジスルフィド結合を切断し、HSA が除去された MIP-NGs のみを回収した。引き続き、HSA 認識空間内に残存するチオール基に蛍光レポーター分子を導入し、蛍光修飾 MIP-NGs を得た。この MIP-NGs に種々の濃度の HSA 溶液を添加し、そのときの蛍光強度を蛍光分光光度計により測定することで、HSA に対する結合挙動を評価した。

【結果と考察】

2-IT 反応後の HSA に導入されたチオール基の個数は約 9.0 個であり、その後 methacryloylethyl pyridyldisulfide を反応して導入されたメタクリロイル基の個数は約 8.5 個であったことから、メタクリロイル基修飾 HSA の合成を確認した。得られた MIP-NGs の DLS 測定結果より粒子径は 18 nm であった。蛍光レポーター分子を導入した MIP-NGs に対する HSA の結合挙動を蛍光強度変化により評価したところ、濃度依存的な蛍光強度変化が観察され、蛍光レポーター分子導入 MIP-NGs を用いて標的タンパク質の蛍光検出が可能であることを明らかにした。

(1) Horikawa R., ***Angew. Chem. Int. Ed.* 55**, 13023-13027 (2016)

Molecularly imprinted nanosensors for fluorescent detection of proteins

Yuki Mizukawa[1], Katsuki Tsutsumi[1], Yukiya Kitayama[1], Toshifumi Takeuchi[1]
[1] Graduate School of Engineering, Kobe University
Tel: +81-78-803-6158, Fax: +81-78-803-6158, E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

2P-079

酵素ナノオブジェクトを用いた多機能薄膜の創製

慶應義塾大学大学院理工学研究科
○溝口 昂太郎・福井 有香・藤本 啓二

【緒言】生体内においていくつかのタンパク質は、分子間相互作用に基づく組織化によって、ユニークな高次構造と複合的機能を有する構造体を形成している。われわれは、これまでにウシ血清アルブミン(BSA)に機能性ポリマーをグラフト化し、それらの組織化をコントロールすることで、ナノスケールで構造と機能を調節したタンパク質構造体(タンパク質ナノオブジェクト)の構築を行ってきた。本研究では、BSA に加えて酵素の表面からポリマーグラフト化を行い、それらを組み合わせて、薄膜状のタンパク質ナノオブジェクトの創製と機能発現を目指した。

【実験】縮合剤の DMT-MM を用いて Glucose oxidase(GOD)のアミノ基に *N*,*N*-Diethyldithiocarbamide acetic acid (DCAA)を反応させて、iniferter 基の導入を行った(GOD-*i*)。次に、この GOD-*i* に両親媒性の *N*,*N*-Dimethylacrylamide (DMAA)を加え、5ºC において UV 照射(高圧水銀灯、365 nm)をすることでリビングラジカル重合を行った(GOD-D)。得られた GOD-D について、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による分子量測定と円偏光二色性測定(CD)によるタンパク質の二次構造変化の検討を行った。また、GOD-D の酵素活性評価として、基質の *β*-D-Glucose を加え、発生した H_2O_2 を Peroxidase(POD)の活性から評価した。この際、基質として発色試薬(Phenol、4-Aminoantipyrine)を加え、酸化縮合による吸光度(505 nm)の増加を検出した。続いて、撥水性を付与するために GOD-D から 2,2,2-Trifluoroethyl methacrylate(3FMA)のグラフト共重合(GOD-D-F)を行い、X 線光電子分光法(XPS)による元素分析を行った。同様に BSA を用いて BSA-D と BSA-D-F の作製を行った。次に、減圧乾燥などによって種々の基板上にグラフト化タンパク質のコーティングを行い、薄膜の形成と剥離を試みた。作製した薄膜について、接触角測定、走査型電子顕微鏡(SEM)による形状観察、耐水性の確認および酵素活性評価を行った。

【結果と考察】GPC 測定より、UV 照射時間とともに BSA-D と GOD-D の分子量が増大することがわかった。また、CD 測定より、DMAA ポリマーをグラフト化してもタンパク質の二次構造はほとんど変化しないことがわかった。さらに、GOD-D の酵素活性において最大速度 *V* の低下がみられたが、3 時間後には未修飾の GOD と同等の発色を示した。グラフト化ポリマーによって基質の拡散が阻害されたことによると考えている。グラフト化によって、水だけでなくメタノールにも溶解するようになり、DMAA ポリマー由来の両親媒性を示すことがわかった。次に、これらグラフト化タンパク質をメタノール水溶液に溶解して、3FMA のグラフト共重合を行ったところ、XPS による分析からフッ素原子が検出された。次に、ポリプロピレン基板へのコーティングを行ったところ、GOD-D-F では薄膜を形成することがわかった。この薄膜の接触角は 104º となり、3FMA ポリマー由来の撥水性を示した。おそらく、3FMA ポリマー鎖間の疎水性相互作用によってタンパク質間およびタンパク質-基板間が強固に結合したためだと考えている。次に、BSA-D-F と GOD-D-F の水溶液をナスフラスコ内で減圧乾燥することで薄膜を形成した。その後、水中に浸漬したところ膜は自発的に剥離し、膜厚約 2.0 μm の薄膜が得られた。GOD-D-F 膜の剥離面の接触角は 92º であり、平滑な表面であった。この膜上に *β*-D-Glucose と発色試薬を滴下したところ、Glucose 濃度に依存した発色が観察され、酵素活性を有する撥水性の薄膜を作製することができた(Fig. 1)。

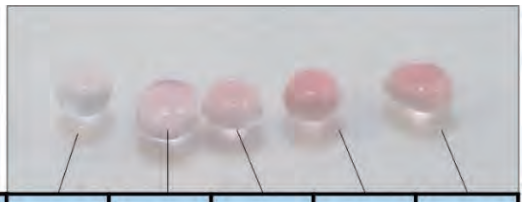


Fig. 1 Detection of glucose by a sheet of GOD-D-F.

Glucose /mg dL^{-1}	12.5	25.0	50.0	125	250
Absorbance	0.051	0.070	0.262	0.594	0.730

Fabrication of multi-functional thin films assembled from enzyme nano-objects

Kotaro MIZOGUCHI, Yuuka FUKUI and Keiji FUJIMOTO
Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: +81-45-566-1580, Fax: +81-45-566-1551, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

2P-080

表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた microRNA の複数同時検出

[1] 東理大基礎工, [2] 順天堂大医, [3] 東理大基礎工教養, [4] 理研前田バイオ
○喜種椋一[1]，石原量[2]，秋山好嗣[3]，猪股祥子[1]，細川和生[4]，前田瑞夫[4]，菊池明彦[1]

【緒言】　がんは，日本人の 2 人に 1 人が生涯の内一度は罹患するといわれている病気である。がんに罹患すると，血中循環 microRNA (miRNA)の濃度が変化する[1]。濃度変化する miRNA の種類は，がんの病種と病期によって異なるため，複数の miRNA の同時検出はがん検査において非常に重要である[2]。また，がん検査は，時間と費用がかかるため，短時間かつ低コストで診断可能なデバイスが求められている。そこで本研究では，poly(dimethylsiloxane) (PDMS)製のマイクロ流路を有するマイクロチップに着目した。このマイクロチップは，低コストで簡便に作製でき，流路表面に高分子鎖を修飾することで，miRNA[3]や細胞外ベシクル[4]などの，がんのバイオマーカーを短時間かつ簡便に検出できる。これまでの研究[3]では，マイクロチップの 1 つの流路に対して 1 種類の miRNA しか検出できなかったが，本研究では 1 つの流路に対し 2 種類の蛍光を用いて，肝臓，および前立腺がんのバイオマーカーである miR-500a-3p[5]，および miR-16[6]の 2 つの miRNA の同時検出を目的とした。

【実験】　電子線グラフト重合法によって，poly(glycidyl methacrylate)鎖を修飾したマイクロチップの流路を，補捉用プローブ DNA 混合液 (50 µmol/L, CP16, CP500)で満たし，37°C で 2 時間静置して流路表面に CP DNA を固定した。また, CP DNA が 1 つの流路に 2 種類固定されていることを確認するために，二つの異なる色で蛍光標識された CP DNA を固定したチップを作製し，固定量を定量した。その後 1 時間以上脱気し，表面機能化自律駆動 (SF-PF)マイクロチップを得た。miRNA の検出は，検出用の蛍光標識プローブ DNAs (DP16-Flu，DP500-TMR)と miRNA をチューブ内で 5 分間静置することで相補鎖を形成させ，流路内をブロッキング後，この溶液を 5 分間チップに通液し，最後に流路を 7 分間洗浄した後，蛍光強度を測定し評価した。

【結果と考察】　蛍光標識 CP DNA によって，1 つの流路に 2 つの CP DNA がほぼ同量固定できていることを確認した。SF-PF microchip を用いて miRNA を検出した結果を **Fig. 1** に示す。2 種類同時および単独の miRNA 検出において，標的 miRNA と control シグナルの間に *t* 検定による 5% 水準で有意差があった。また，単独の miRNA の検出において，流路に導入していない miRNA のシグナルは control と同程度であった。

以上のことから, SF-PF マイクロチップに 2 種類の CP DNA を固定することで，2 種類の蛍光を利用して標的 miRNA を選択的かつ複数同時に検出できることが実証できた。今後，本研究で作製した SF-PF マイクロチップのがん検査への貢献が期待できる。

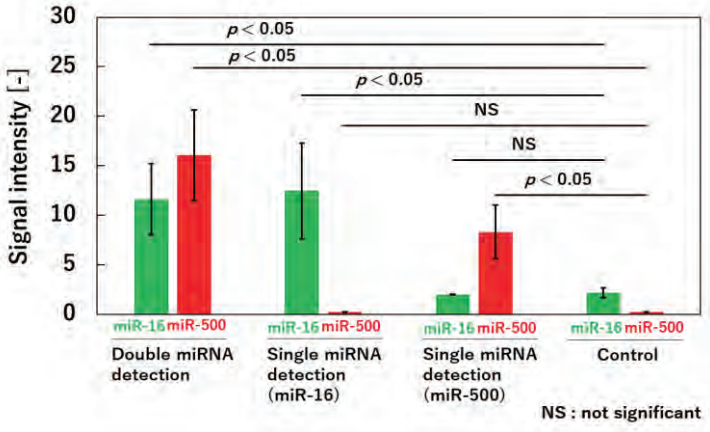


Fig. 1 Duplex detection of miRNA on the SF-PF microchip (n=3, mean ± SD.)

【参考文献】　[1] P. Mitchell *et al.*, *PNAS*, **2008**, 105, 10513-10518. [2] M. Tsujiura *et al.*, *Br. J. Cancer*, **2010**, 102, 1174-1179. [3] R. Ishihara *et al.*, *Anal. Sci.*, **2017**, 33, 197-202. [4] R. Ishihara *et al.*, *ACS Omega*, **2017**, 2, 6703-6707. [5] Y. Yamamoto *et al.*, *Biomarkers*, **2009**, 14, 529-538. [6] A. Schaefer *et al.*, *Int. J. Caner*, **2009**, 126, 1166-1176.

Multiplex Detection of MicroRNAs on the Surface-Functionalized Power-Free Microchip

Ryoichi Kitane[1], Ryo Ishihara[2], Yoshitsugu Akiyama[3], Shoko Inomata[1], Kazuo Hosokawa[4], Mizuo Maeda[4], Akihiko Kikuchi[1] [1]Dept. Mater. Sci. & Technol., Tokyo Univ. Sci. (6-3-1 Niijuku, Katsoshika, Tokyo 125-8585, Japan), [2]Fac. Med., Juntendo Univ. (1-1 Hirakagakuendai, Inzai, Chiba, 270-1695, Japan), [3]Fac. of Ind. Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Sci., (102-1 Tomino, Oshamambe-cho, Yamakoshi-gun, Hokkaido 049-3514, Japan), [4]Bioeng. Lab., RIKEN (Wako, Saitama 351-0198, Japan)
[2]Tel: +81-476-98-1001, Fax: +81-476-98-1011, E-mail: r-ishihara@juntendo.ac.jp

2P-081

高選択・高感度センシングを指向したハイドロゲル支持プラズモニックセンサの開発

[1] 大阪府立大学大学院　工学研究科，[2]JST さきがけ
○山田　大空[1]，川﨑　大輝[1]，井上　千種[1]，前野　権一[1]，
末吉　健志[1]，久本　秀明[1]，遠藤　達郎[1,2]

【緒言】 金属ナノ構造は、その表面において自由電子の集団振動と光電場振動の共鳴(局在表面プラズモン共鳴： Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)に起因する特定波長光吸収・増強電場形成を示す。LSPR の共鳴波長は周辺の屈折率によって変化するため、金属ナノ構造を周期的に配列したプラズモニック結晶(Plasmonic Crystal: PC)は、ナノ構造近傍での生体分子の結合・解離に起因した屈折率変化を検出する非標識センサとしての応用が進められている。LSPR 波長の変化は電場発生領域での屈折率変化により生じるため、PC センサの感度向上には測定対象物質を電場発生領域に効率よく導入する手法が必要である。

一方我々は最近、ナノ構造転写技術であるナノインプリントリソグラフィ(Nanoimprint Lithography: NIL)を用いた大面積・簡便な PC 作製に成功した。NIL では、様々なポリマー材料を支持基材に利用できるため、蛍光色素・分子認識分子等、高機能分子の支持基材内導入によって、PC の高機能化が期待できる。そこで本研究では、ハイドロゲルを支持基材とした PC を着想した。ハイドロゲル支持 PC は、ゲル内に電場発生領域と分子認識分子(抗体・一本鎖 DNA 等)を導入でき、ゲル網目の分子ふるい効果による妨害物質の除去も期待できる。 今回は、PC の試作、ゲル特性・光学特性の評価から、コンセプトの確認を行ったので報告する。

【実験】 Au 厚さ 100 nm の PC を、NIL プロセスで作製した。支持基材のハイドロゲルとして poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA)、認識素子固定化に用いるカルボキシ基導入用の Acrylic acid (AAc)を PEGDA+AAc=99 v/v%となるよう調製し、重合開始剤の 2-Hydroxy-2-methyl propiophenone (HOMPP)を 1 v/v%添加して光重合を行った。今回は AAc 濃度を 0, 20, 40 v/v%として PC を作製した。

ゲル特性評価では、タンパク質浸透能調査を行った。ここでは、2 mm 四方の四角型流路内にゲルプレポリマー溶液を導入、重合させた後、50 μg/ml Anti-mouse IgG-TRITC (in 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4)を導入して 5, 30 min 経過後の蛍光強度を測定した。

一方、光学特性評価では、ハイドロゲル支持 PC 内外のバルク屈折率応答を評価した。ここでは、乾燥・水中条件下での PC による反射吸収スペクトルを測定した。

【結果と考察】 NIL で作製した PC の形状を走査型電子顕微鏡により観察した結果、PC 構造が確認できた。ゲル特性評価では、AAc 濃度が 20, 40 v/v%の条件でタンパク質の浸透が確認され、一方で 0 v/v%の条件ではタンパク質の浸透が見られなかったことから、ゲル濃度の検討による分子ふるい能調節の可能性が示唆された。

一方、光学特性評価においては、波長 510 nm, 660 nm 近傍に 2 つの吸収ピークが確認できた。電磁場解析によるピークの帰属から、各ピークはそれぞれゲル外部、ゲル内部の電場発生に寄与する LSPR 由来の吸収であると考えている。水を加えた際の吸収ピークシフトからは、ゲル内部の電場発生に寄与するピーク(660 nm)のシフト量が外部のもの(510 nm)のおよそ 2 倍であった。このことは、ゲル内部での分子測定の優位性を示していると考えている。

Development of hydrogel supported plasmonic sensor for highly selective and sensitive detection

Hirotaka Yamada[1], Daiki Kawasaki[1], Chigusa Inoue [1], Kenichi Maeno[1],
Kenji Sueyoshi[1], Hideaki Hisamoto[1], Tatsuro Endo[1,2]
[1]Graduated School of Engineering, Osaka Prefecture University [2]JST PRESTO
Tel: +81-72-254-8550, Fax: +81-72-254-9284, E-mail: sxb02146@edu.osakafu-u.ac.jp

2P-082

血中循環腫瘍細胞を高感度検出するためのフィルターの開発

富山県産業技術研究開発センター　ものづくり研究開発センター
○寺田　堂彦，大永　崇

【緒言】血中循環腫瘍細胞（Circulating tumor cells, CTC）とは、癌組織から漏れ出して末梢血中を循環している腫瘍細胞である。血液 1 mL 中に血液細胞が 10^9 個存在するのに対し、CTC は数～十数個程度しか存在しない。しかし、それらは癌の転移、拡大において重要な役を担っているといわれている。また、直径 5 mm 以下の初期癌からも CTC は発生するといわれているため、血液中から CTC を高感度で検出することが可能となれば、採血により癌を早期に発見できるため、画期的な診断ツールとなり得ると期待されている。しかしながら、現行で主流の抗上皮細胞接着分子（EpCAM）抗体をマイクロ流路等と組み合わせた捕捉システムでは、EpCAM 発現の低い CTC の捕捉確率は極端に低下してしまう。そこで、本研究では、ナノマテリアルの材料特性（極低流体抵抗や比表面積など）を利用することにより、抗原抗体反応を最大効率化し、表面抗原の発現量の多寡に関わらず、CTC を高感度検出するためのフィルターの開発を目的とした。

【実験】所定量のキトサン（Mv = 4.8×10^5）とポリエチレンオキシド（Mv = 4.0×10^6）を 90%酢酸水溶液に溶解したものをエレクトロスピニング法により紡糸した。得られた繊維試料を中和、水洗した後、各実験に供した。末端にビオチンおよび N ヒドロキシスクシンイミドエステルを有するポリエチレングリコール（b-PEG、Mn = 3000）を繊維表面に修飾した後、未反応アミノ基にメトキシ末端 PEG（m-PEG、Mn = 2000）を修飾した（Fig.1）。b-PEG 末端のビオチンにアビジンを介してビオチン化抗 EpCAM 抗体を固定した。高 EpCAM 発現 CTC、低 EpCAM 発現 CTC それぞれのモデル細胞として、ヒト食道癌由来細胞（KYSE220）、ヒト乳腺癌由来細胞（MDA-MB-231）を用いて実験を行った。

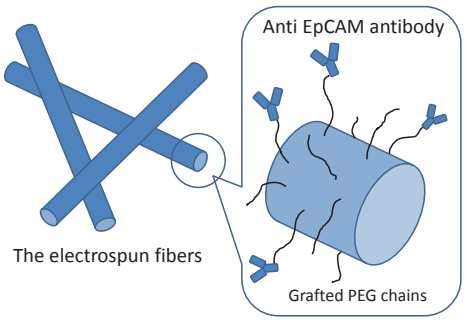
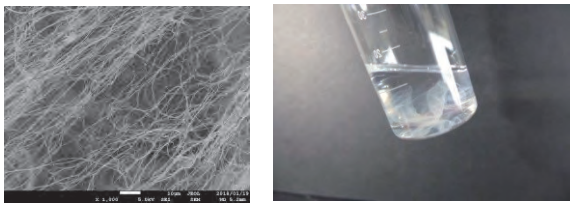


Figure 1 Schematic diagram of the surface-functionalized electrospun-fibers.


Figure 2 SEM image of the electrospun fibers (left) and photo of the spongy fiber (right).

【結果と考察】エレクトロスピニング法により、比較的均質な繊維（平均径 127 nm、SD=18、n=40）が得られていることを確認した。また、エタノール液面をコレクターとして繊維を捕集することにより、疎な繊維集合体が得られることを確認した（Fig.2）。分子鎖に沿って無数のアミノ基を有するキトサンは、細胞接着性を呈する材料として知られている。また、ECM を構成する線維と近しいスケールを有する材料は、一般的に細胞接着性が向上するため、今回得られている繊維には、標的とする細胞以外の非特異接着が生じると予想される。実際に、MDA-MB-231 は、カバーガラス表面に疎な状態で紡糸された未修飾繊維に対して、スピンコートフィルムや TCPS に対してよりも短時間で接着する様子が確認された。そこで、白血球等の非標的細胞の接着を抑制するために、m-PEG 修飾を行ったところ、未修飾繊維の場合で認められた細胞-材料相互作用による非特異的な細胞接着を抑制できた。一方、b-PEG と m-PEG とを複合修飾し、b-PEG 末端に抗 EpCAM 抗体を固定した繊維上では、播種直後に抗原抗体反応に起因すると思われる接着が生じ、緩やかな PBS 洗浄処理を行った後にも、ある程度の細胞数が保持される様子が確認された。標的とする特定の細胞とのみ、効率的に抗体抗原反応を高めるフィルター素材となりうると考えられる。

Development of the Filter System Detecting Circulating Tumor Cells

Dohiko Terada, Takashi Ohnaga
MONOZUKURI R&D Center, Toyama Industrial Technology R&D Center
Tel: +81-766-21-2121, Fax: +81-766-21-2402, E-mail: terada@itc.pref.toyama.jp

2P-083

ポリドーパミン層を基材とした細孔表面の簡便な表面機能化

[1]東京医科歯科大学　生体材料工学研究所
○堀口　諭吉[1]，合田　達郎[1]，宮原　裕二[1]

【緒言】コールターカウンターとして知られる細孔電気抵抗法（RPS）は、細孔を通過する粒子をイオン電流値の変化から読み取る分析装置で、血球や細菌、細胞などの計数に用いられている。近年では細孔形成技術の革新により、ナノオーダーの微細な細孔を用いてタンパク、ウイルス、細胞外小胞等の計測が報告されている。RPS では、検体が通過する際のイオン排除を電流値としてリアルタイムでモニタリングするため、検体の大きさや、形状、ゼータ電位などの評価が可能である。一方で得られる計測データは物理的な情報に限られ、検体の生物学的な特異検出を行う場合、分子修飾を施した人工界面を細孔に適用する必要がある。表面修飾プロセスは細孔の材料に依って制約を受けるほか、高コスト化にも繋がるため、これを解決する手法が求められる。そこで、本研究ではシンプルかつ容易なポリドーパミンを介した表面の機能化について着目した。ポリドーパミンはムール貝が岩などに接着する際に用いられる材料で、貴金属を始め、金属酸化物、半導体、セラミック、ポリマーなど多くの表面に接着が可能な分子である[1]。形成されたポリドーパミン層はアミノ基やチオール基を介した分子修飾が容易であるため、幅広く応用が可能な手法と考えられる。本研究ではポリドーパミン層を介した修飾法がサブマイクロオーダーの非常に小さな細孔を機能化する上でも有効な手法であることを示すため、分子修飾を実施し、細孔の分子層形成について電流値特性により評価した。

【実験】粒度分布・粒径測定ナノ粒子マルチアナライザー「qNano」に使用するポリウレタン製ポア、NP100 をドーパミン液中（2 mg/mL）に浸漬させ、振盪機上でポリドーパミン層形成を行った。その後アニオン性チオール分子である 11-メルカプトウンデカン酸液中に浸漬し、ポリドーパミン層上にチオール分子層を形成させた。得られた分子修飾ポアについて qNano を用いて I-V 特性を計測した。

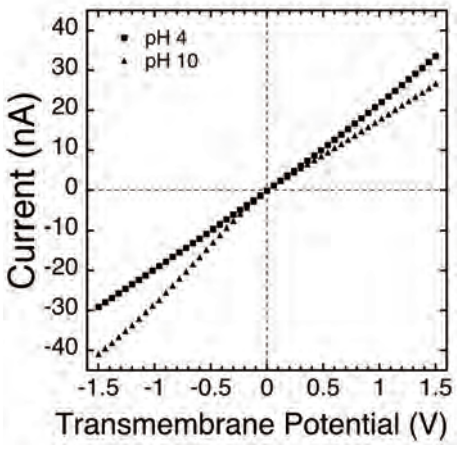


Figure 1 I–V measurement curves of pore (NP100) in different pH after the immobilization of polydopamine and 11-mercaptoundecanoic acid (MUA).

【結果と考察】分子修飾後、細孔を流れるイオン電流の I-V 特性について評価したところ、修飾前には見られなかった pH 依存的な I-V 特性が確認された（Figure 1）。これは 11-メルカプトウンデカン酸が表面に修飾されたことで、アルカリ性条件下において表面がアニオン化するためである。pH 4 においては I-V 特性に大きな屈曲は見られないが、pH 10 では表面のアニオン化によりイオンの移動に制約が生じた結果、整流効果が出現したと考えられる。以上から本手法が簡便な細孔の機能化手法として有効であることが示された。任意の分子をポリドーパミン層に固定化することで目的に応じた自由な細孔の表面修飾が可能であり、非常に汎用性が高い手法となりうる。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議が主導する革新的研究開発推進プログラム（ImPACT）の一環として実施したものです。

【参考文献】
1）H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, and P. B. Messersmith, Science 318,426 (2007).

Easy functionalization technique for a small pore with a polydopamine layer

Yukichi Horiguchi[1], Tatsuro Goda[1], Yuji Miyahara[1]
[1]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
Tel: +81-3-5280-8097, Fax: +81-3-5280-8135, E-mail: horiguchi.bsr@tmd.ac.jp

2P-084

アクリルアミド–アクリル酸共重合体ゲルを用いた組織透明化と蛍光イメージング

大阪府立大学大学院工学研究科　物質・化学系専攻　応用化学分野
○大野優太，児島千恵，松本章一

【緒言】
蛍光イメージングは、生命現象の解明や病気の診断に有用であり、三次元的な蛍光イメージングのための組織の透明化技術がおおいに注目されている。近年、Chung らは組織透明化手法である CLARITY 法を開発した。CLARITY 法では、①マウス組織をアクリルアミド(AAm)ゲルに包埋した後に、②脂質を除去し、③媒体の屈折率を調節することで透明化している [1, 2]。多くの場合、組織透明化は脳や胚などで実施されており、ゲル化試薬は灌流固定時にモデル動物に投与されている。透明化技術の用途展開を考えると、様々な臓器を摘出後に透明化することが望まれる。我々は、これまでに、アニオン性のスチレンスルホン酸ナトリウム(SS)と AAm と *N*,*N*'-メチレンビスアクリルアミド(bisAA)を共重合したアニオン性ゲルを用いることによって、摘出した組織の透明化を迅速に行えることを示してきた。これは、アニオン性ゲルでは負電荷の反発によって膨潤し、脂質の透過性が向上したためと考えられる [3]。しかし、緑色蛍光蛋白質(GFP)を発現した組織をこの手法で透明化し蛍光イメージングを行ったところ、蛍光強度が減弱してしまった。そこで、本研究では、アクリル酸(AcA)と AAm の共重合体ゲルを用いて透明化を行った。種々の臓器由来の組織の透明化処理を行い、透明化に挙動を比較した。そして、GFP を発現した組織や蛍光剤で染色した組織の蛍光イメージングを行った。

【実験】
種々の臓器（脳、腫瘍、心臓、肺、胃、すい臓、脾臓、腎臓、十二指腸、盲腸）の組織切片(3×2×0.7 mm)に、AAm/AcA=25/75 の仕込み組成のモノマー、さらに bisAA、VA-044 およびパラホルムアルデヒドを浸透させた後、37 ℃で 24 時間重合し、組織包埋ゲルを作製した。余分なゲルを除いた組織片を、4%ラウリル硫酸ナトリウムを含むホウ酸バッファーで所定期間振とうし、脂質の除去を行った後、エチレングリコールに浸した。各過程の組織の透明性評価を評価するとともに、透明化処理後の組織の蛍光観察を行った。

【結果と考察】
種々の臓器の透明化において、脳、肺と胃は脂質除去 3 日目で高い透明性が得られた。一方、脾臓、腎臓、膵臓、心臓は除去 3 日目において不透明であっが、除去 11 日目においてより透明性が向上した。しかし、盲腸は 11 日後でも透明化できなかった。したがって、臓器の種類によって透明化にかかる時間が異なることがわかった。

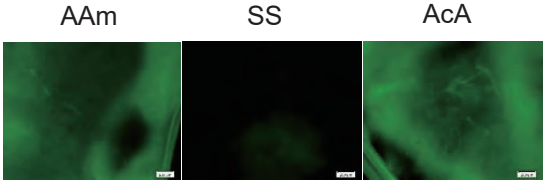


Figure 1. Fluorescence imaging of GFP-expressing mouse's brain after optical tissue clearing using various hydrogels.

様々なゲルを用いて透明化処理した GFP を発現したマウスの脳組織の蛍光観察を行った。SS の場合とは異なり、AcA では AAm のみの場合と同程度の高い蛍光が観察された（図１）。これより、AcA 共重合体ゲルを用いると、蛋白質を変性させることなく、迅速に透明化することができることがわかった。

【謝辞】マウスの様々な臓器、GFP を発現したマウスの脳組織は大阪府立大学大学院生命環境科学科の乾隆教授、東京大学大学院工学研究科の小野寺宏教授よりそれぞれご提供いただいた。

【参考文献】
[1]Chung, K. *et al*. Nature, 497, 332 (2013). [2]Tomer, R.*et al*. Nature Protocols, **9**, 1689 (2014).
[3] Ohno, Y., Matsumoto, A., and Kojima, C. revised.

Optical Tissue Clearing Using Acrylamide/Acrylic Acid Copolymer Hydrogels and Their Application to Fluorescence Imaging

Ohno Yuuta, Chie Kojima and Akikazu Matsumoto
Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai 599-8531, Japan, Tel/Fax: +81-72-254-9292/+81-72-254-8190, e-mail: matsumoto@chem.osakafu-u.ac.jp / kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

2P-085

がんの治療と診断を目的とした機能性高分子マテリアルの開発

[1] 慶應義塾大学　理工学部，[2] 神戸薬科大学
○澤田　和紀[1]，甘中　健登[2]，佐野　紘平[2]，向　高弘[2]，チッテリオ　ダニエル[1]，蛭田　勇樹[1]

【緒言】薬物を必要な場所へ届ける DDS によって、正常細胞に対する副作用を抑えるとともに、薬物分布を制御し、薬の投与量を減らすことができる。これを可能にする試みとして、高分子ミセルなどが、がん部位に蓄積する Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果を利用したものが多数報告されているが、この効果のみによるがん部位への特異性には限界がある。そこで本研究では、がん部位への特異性を向上させるため、EPR 効果に加え、pH 応答性や温度応答性などの機能性を持つ高分子マテリアルの開発を行った。まず、がん部位周辺では pH の範囲が 6.5-6.8、エンドサイトーシス後に輸送される酸性オルガネラでは 5.0-6.0 と正常組織、血液中と比べて pH が低下していることに着目し、EPR 効果によってがん部位に蓄積した高分子ミセルが、がん部位の弱酸性 pH に応答して崩壊し、内包した Indocyanine green (ICG) を放出する pH 応答性高分子ミセルの開発を行った。さらに、温熱療法と組み合わせることを目的とし、末端にラジオアイソトープや蛍光プローブなどの機能性を導入することができるアミノ基を末端に持つ温度応答性高分子、腫瘍部位への集積性を高めることを目的とした、親水機能性高分子キャリアの開発を行った。

【実験】がん細胞周辺と酸性オルガネラの二つの弱酸性環境 pH をターゲットとして、それぞれの pH に応答するブロックと親水ブロックを持つ二種類の両親媒性ブロック高分子を合成した (Fig. 1)。その後、この高分子を用いてミセルを形成しつつ、ICG を内包した。そして、pH 5.6-7.4 の条件において、このミセルの流体力学的直径と蛍光スペクトルの測定を行った。また、異なる二種類のモノマーの比率を調整し、共重合させることによって、体温と外部加温により相転移を示す二種類の高分子を作製した (Fig. 2)。この高分子は、様々な機能性を導入可能なアミノ基を末端に持っている。さらに、この高分子を用いて、温度変化に対する流体力学的直径の変化と Lower Critical Solution Temperature (LCST) の測定を行った。加えて、高い血中滞留性を示しつつ、機能性を兼ね備えた親水性高分子キャリアの合成を行った。

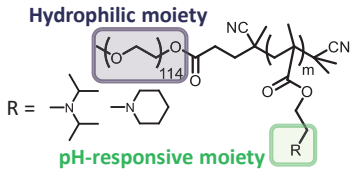


Fig. 1 両親媒性ブロック高分子

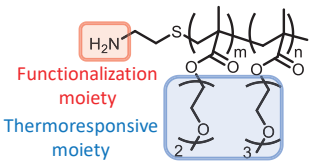


Fig. 2 温度応答性高分子

【結果と考察】
高分子ミセルにおいては、正常組織、血液の pH (pH 7.4) と比べ、低 pH ではミセルが崩壊していること、ミセル崩壊と濃度消光の解消による蛍光強度の増大を確認した。このメカニズムにより、ミセル投与後、血流中の pH では消光していた ICG が、がん部位においてのみ蛍光を発することで、ICG によるがん部位の選択的なイメージングが期待できる。さらに、この二種類の高分子ミセルを用いることで、ICG のがん部位での動態を明確にすること、pH 応答ブロックの pK_a を合成的アプローチにより変化させることで、患者によるがん部位での pH 環境の変化への対応といったオーダーメイド医療にも応用が可能になる。温度応答性高分子においては、約 30℃と 39℃を境にそれぞれ相転移が起きていることを確認した。これにより、腫瘍への直接注射によって体温に応答、あるいは温熱療法を組み合わせることで、静脈注射後に EPR 効果により腫瘍部位に集積し、高分子の相転移を経て、凝集を引き起こすことで、腫瘍部位での滞留性の向上が期待できる。

Development of functional polymer materials for cancer therapy and imaging

Kazuki Sawada[1], Kento Kannaka[2], Kohei Sano[2], Takahiro Mukai[2], Daniel Citterio[1], Yuki Hiruta[1]
[1]Faculty of Science and Technology, Keio University, [2]Kobe Pharmaceutical University
Tel: +81-45-566-156, Fax: +81-45-566-1568, E-mail: hiruta@applc.keio.ac.jp

2P-086

細胞標識を目指した蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドの合成

[1] 東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻
[2] 関西大学化学生命工学部
○大場倭利[1]、最上譲二[1]、森本展行[1]、平野義明[2]、山本雅哉[1]

【緒言】蛍光を利用した細胞イメージングは、移植細胞の体内動態を評価する方法として注目されている。現在、細胞標識法として、蛍光色素を結合させたタンパク質や抗体の選択的結合や、蛍光色素と細胞内の特定部位との相互作用などが利用されている。しかし、細胞毒性や、蛍光色素が脱離するなどの問題が生じることがある。このため、低細胞毒性な方法により安定な細胞標識を実現する技術が望まれている。本研究では、細胞膜に貫通したタンパク質が安定に存在することに着目し、蛍光色素で標識することが可能であり、強固に細胞膜へ結合することができる蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドを合成した。すなわち、α-ヘリックス型ペプチドとして知られる 6K ペプチドをベースに蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドを合成し、得られたペプチドを用いた細胞標識について評価した。

【実験】Fmoc 固相合成法を用いて、RinkAmide AM resin (0.6mmol/g)から段階的にペプチドを伸長し、末端に親水的タグとしてリシン(K)を、中心部に疎水的αヘリックスを形成する AAALAAAAALAAWAALAAA 配列をもった 6K ペプチドを合成した。これを比較対象とし、N 末端をアルギニン(R)化した 2R4K ペプチド、4R4K ペプチド、および 6R4K ペプチドを合成した。得られたペプチドに対して、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)により質量分析を行った。マトリックスとして CHCA を飽和状態まで溶かした溶媒(水:アセトニトリル:トリフルオロ酢酸=70:30:0.1)を用いた。合成ペプチドの二次構造を調べるために、塩化ナトリウム（10 mM）を含むトリス-塩酸緩衝液（ pH7.0,10mM）を溶媒としたサンプル溶液（0.1mg/mL）に対して円偏光二色性(CD)スペクトルを測定した。さらに、蛍光色素（FITC）を N 末端に対して修飾した蛍光標識ペプチドを、HeLa 細胞とともに 1 時間インキュベーション後、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて細胞を観察した。

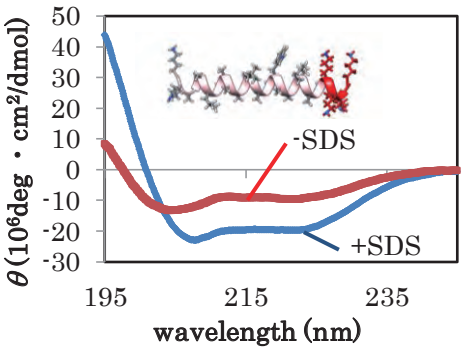


図 1 6K ペプチドの CD スペクトル

【結果と考察】MALDI-TOF-MS により、目的のペプチドの質量ピークが観測された（データ省略）。CD 測定の結果 222 nm にαヘリックス由来のピークが確認された（図 1）。細胞膜環境を模倣するために添加したドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の存在下では、αヘリックスの形成が促進された。CLSM を用いた蛍光観察の結果、アルギニンが N 末端に修飾されたペプチドが細胞膜に結合することがわかった。一方、細胞内部への透過も認められたため、膜透過能が高すぎることが示唆された（図 2）。

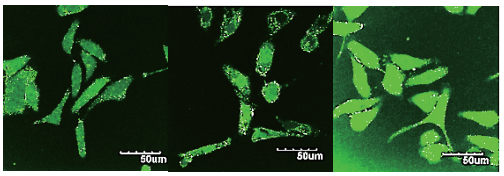


図 2 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察(左から 2R4K,4R4K,6R4K)

Synthesis of cell-membrane-anchoring peptides for cell labeling

Wato Oba[1], George Mogami[1], Nobuyuki Morimoto[1], Yoshiaki Hirano[2], Masaya Yamamoto[1]
[1]Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University
[2]Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University
Tel:+81-22-795-7313, Fax:+81-22-795-7313 E-mail:Wato.oba.p8@dc.tohoku.ac.jp

2P-087

加速溶出試験を用いた金属イオン溶出・蓄積挙動の評価とアレルギー性の検討

[1] 東京医科歯科大学大学院　医歯学総合研究科，[2] 東京医科歯科大学　生体材料工学研究所
○猪股泰将[1]，堤　祐介[2]，蘆田茉希[2]，陳　鵬[2]，土居　壽[2]，塙　隆夫[2]

【緒言】 医療に用いられる材料は、人体機能の修復や再建に役立てられており、その中でも金属材料は優れた機械的性質を示すため、主に耐荷重が要求されるインプラントデバイスにおいて中心的な役割を果たしている。しかし、金属材料は腐食によって金属イオンを環境中に放出するため、使用の際にはその毒性による人体への影響を十分に考慮する必要がある。また、金属アレルギーは金属イオンが原因で発症に至るため、インプラントデバイスの腐食と金属のアレルギー性は密接な関係にあると考えられるが、この相関についての研究はほとんど報告がない。当研究グループでは生体環境中への金属イオンの放出と蓄積に着目し、腐食という観点から金属材料のアレルギー性の評価を試みてきた。本大会では、金属アレルギーの報告例が多いコバルト（Co）、ニッケル（Ni）、銅（Cu）、パラジウム（Pd）や、医療用金属材料に多用されている一方、そのアレルギー性がほとんど解明されていないモリブデン（Mo）を対象に、加速溶出試験を用いた評価を実施し、そのアレルギー性の検討を行った。

【実験】 試料には市販の純金属を用いた。試験溶液には pH 3.5 に調整した無機成分のみの人工汗、その溶液にヒスチジン、パントテン酸、アスパラギン酸、尿素を添加した人工汗、pH 7.5 に調整したトリス塩酸緩衝液、その溶液に 10 vol%ウシ胎児血清を加えた溶液を調製して使用した。図 1 に加速溶出試験の概略図を示す。試験では、ガラスシャーレの底面に試料を貼りつけ、ジルコニアボールを敷き詰めたフッ素樹脂容器に試験溶液とともに入れ、シェーカーで振とうさせた。試験溶液は、1、3、6、18、24、48 h 経過時に回収した。回収溶液は 1 vol%硝酸水溶液で 10 倍に希釈して保存した。得られた溶液中に含まれる金属イオンの濃度を ICP-AES により測定した。溶液に着色が確認されるものについては、金属イオンの配位状態を分光光度計により評価した。

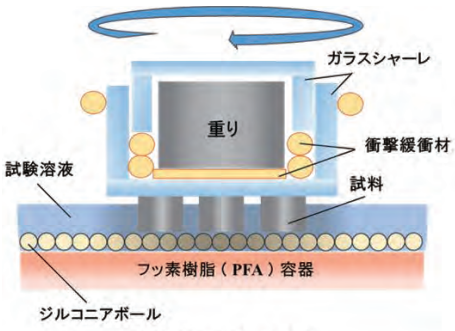


図1 加速溶出試験の概略図

【結果と考察】 加速溶出試験から、各元素の金属イオンの蓄積挙動を評価が可能であった。Co、Ni、Cu、Pd は人工汗中において比較的高濃度の金属イオンの蓄積が確認され、特にタンパク質が存在する環境中において金属イオンの蓄積量が増大することが明らかとなった。一方、Mo はタンパク質の存在に関わらず、環境中へのイオン蓄積はほとんど生じなかった。これらの結果から、金属イオンと特定のタンパク質との結合が金属イオンの蓄積量にも影響し、アレルギー性の支配因子の一つとなっていることが示唆された。また、Mo はこれらの元素とは異なり、環境中への金属イオンの蓄積が起こりにくいことがわかった。さらに、不働態皮膜を生成する元素や合金は、たとえ不働態皮膜が破壊されるほどの摩耗を受けても、皮膜の修復過程において放出される金属イオンはごく微量であり、結果的に、金属イオンの環境中への蓄積が大幅に抑制されることが示唆された。本研究より、生体環境中への金属イオンの蓄積のしやすさと金属材料のアレルギー性には相関があることが明確に示された。

Investigation of relationship between metal-ion release and allergic property by accelerated dissolution test

Yasumasa INOMATA[1], Yusuke TSUTSUMI[2], Maki ASHIDA[2], Peng CHEN[2], Hisashi DOI[2], Takao HANAWA[2]
[1]Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
[2]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8011, E-mail : ma170015@tmd.ac.jp

2P-088

擬似体液中へのカルサイト浸漬によって誘起された石英ガラス基板上におけるリン酸カルシウムの形成

[1] 立命館大学理工学研究科，[2] 立命館大学理工学部
○齋藤　祐幹[1]，平井　豪[2]，勝野　弘康[2]，中田　俊隆[2]

【緒言】
擬似体液（以下 SBF）を用いたバイオミメティック法によって、$CaO\text{-}SiO_2\text{-}P_2O_5$ などの多成分ガラス表面上にリン酸カルシウム化合物が形成されることは広く知られている。この際、ガラス表面からの Ca イオンの溶出及び、それに伴う Si-OH 基の生成がリン酸カルシウム化合物の形成機構において重要であると考えられている。しかしながら、この二つの現象は一つのガラス基板で同時に起こっているため、個々の影響を独立して制御し、評価した研究はほとんどない。そこで本研究では、基板として石英ガラスを、Ca イオン溶出源としてカルサイトを用いることで二つの現象を空間的に独立させ、これらを SBF に浸漬させた際のリン酸カルシウム化合物の形成過程を観察した。

【実験】
Ca イオンの溶出源として約 0.2g の天然カルサイト結晶（$CaCO_3$, 菱形劈開 2 級, Mexico 産, ニチカ）を、基板として合成石英ガラス（SiO_2, Si≧99. 99%, 11 mm×12 mm×1.0 mm, ケニス）を使用した。SiO_2 基板のみ、もしくは SiO_2 基板にカルサイトを載せたものをそれぞれ 28. 6ml の SBF に 36. 5℃で約 1〜14 日間浸漬させた。基板表面に形成された析出物の形態および構造を走査型電子顕微鏡（SEM）や X 線回折装置（XRD）を用いて評価した。またフーリエ変換型赤外分光光度計（FT–IR）やエネルギー分散型 X 線分析装置（EDX）を用いて、析出物の結合状態、組成分析を行った。

【結果と考察】
SBF に SiO_2 基板のみを浸漬した場合、浸漬時間によらず基板表面に析出物は確認されなかった。一方で、カルサイトを SiO_2 基板表面に載せた場合、浸漬させた約 1 日後からカルサイト近傍の SiO_2 基板表面に数 μm 程度の球状析出物が形成した。この析出物には、EDX より Ca や P が含まれること、FTIR から PO 結合が存在することが確認された。また XRD パターンから浸漬直後においては、析出物は非晶質であり、浸漬時間の増加とともに結晶化することが示させた。しかしながら、この結晶は、SBF に多成分ガラスを浸漬させた際に観察される骨類似アパタイトではなく、その前駆体であるリン酸水素カルシウム二水和物であることが明らかとなった。

The effect of calcite soaking in SBF on forming calcium phosphate on SiO_2 substrate

Hiroki Saito[1], Takeshi Hirai[2], Hiroyasu Katsuno[2], Toshitaka Nakada[2]
[1]Department of Physical Sciences, College of Science and Engineering, Ritsumeikan University, [2]Department of Physical Sciences, Ritsumeikan University
Tel: +81-77-561-3392, E-mail: rp0047hf@ed.ritsumei.ac.jp

2P-089

段階的折り畳み様形状回復を実現する温度応答型生分解性形状記憶ポリマー材料の作製

[1] 関西大化学生命工・[2] 関西大 ORDIST ・[3] 関西大医工薬連携研究セ
○川岸弘毅[1]，能﨑優太[2]，葛谷明紀[1,3]，大矢裕一[1,3]

【緒言】
近年，形状を変形・固定させた後，温度変化に応答して元の形状へ回復する温度応答性形状記憶ポリマーの研究が行われている。形状記憶特性の発現には，高分子鎖に元の形状(永久形状)を記憶するための架橋点と，一時的な形状(一次記憶)へ固定する可逆的な固定相(結晶相)が必要であり，その結晶相が温度上昇に伴い融解することで，一時的な形状から元の形状へ回復する。こうした形状記憶ポリマーで生分解性を有するものは，医療材料などへの応用が期待されている。しかし，従来の形状記憶ポリマー作製方法で可能な形状には限界があり，小さく折り畳んだ状態から広がる方向へ形状回復するフィルムの作製は容易であるが，その逆の広がった状態から折り畳まった状態へ形状変化する立体構造物の作製は困難である。これは，折り畳まった状態の鋳型を作製することが難しいことが主要因である。

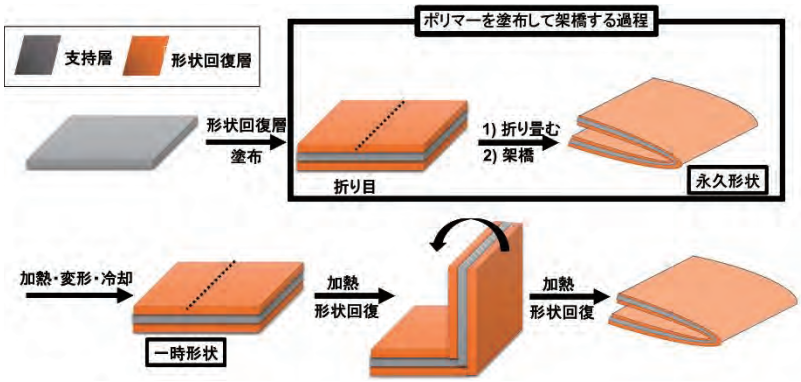


Figure 1. Preparation of shape-memory materials folding to mutiply folded shapes.

　これまでに我々は，鋭敏な温度応答性を示す生分解性形状記憶ポリマーとして分岐型ポリカプロラクトン(Branched PCL: br-PCL)架橋体を開発した[1]。今回，架橋前の液状ポリマーを平面支持層全体の両側に塗布し，目的の形状へ折り畳んだ後に架橋することで，鋳型を用いることなく，複雑な形状を永久形状とした形状記憶材料の開発に成功した(Fig. 1)。この手法を用いれば，折り紙細工のように複数回折り畳んだ複雑な形状へと回復する材料の作製が可能となる。本発表では，br-PCL フィルムを折り畳むことで作製した形状記憶材料の形状回復能について，定量的評価を試みた結果を報告する。

【実験・結果・考察】
平均 8 個の水酸基を有する polyglycerine の水酸基を開始点とした ε-caprolactone (CL)のバルク開環重合により，1 本あたりの重合度(DP)=19，26 の br-PCL を合成した。得られた br-PCL を加熱溶融し，Hexamethylenediisocyanate (HMDI)と混合後，架橋反応させることにより，正方形型の br-PCL フィルム(支持層)を作製した。そして，DP=19, 26 の br-PCL を支持層の異なる折り目部分に対して形状回復層として幅約 2cm で塗布し，4 つ折りにしてから加熱して架橋反応を行うことで，3 層構造を有する形状記憶フィルムを得た。DP=26 の br-PCL は，DP=19 の br-PCL と比較して約 10°C 形状回復温度が高いことを利用して，折り目ごとに異なるポリマーを塗布して折り畳み順序を制御した。その結果，温度上昇に伴って意図した通りの順序で，段階的に 2 回折り畳まれた構造の元の形状に回復する形状記憶フィルムを作製が可能であった。さらに，広がった状態（一時形状）の正方形の四隅の点間の距離が折りたたまれることによりどれだけ近接したかを測定することにより，形状回復能を定量的に評価した。

【参考文献】
1) K. Nagahama, Y. Ohya *et al., Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 1789–1794.

Preparation of temperature-responsive biodegradable shape memory polymer materials realizing stepwise multiple shape-recovery to folded states

Kouki KAWAGISHI[1], Yuta YOSHIZAKI[2], Akinori KUZUYA1, [3], Yuichi OHYA1, [3] (1Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, [2] ORDIST, and [3]CEMP, Kansai University, 3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, Japan) 1Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: yohya@kansai-u.ac.jp

2P-090

バクテリアセルロースナノファイバーを導電性ポリマーで被覆した高含水ゲル電極の開発

大阪大学大学院工学研究科
○東垣　達也・麻生　隆彬・宇山　浩

【緒言】生体情報を抽出または生体内代謝をエネルギーに変換するためのウェアラブルデバイスやインプラント材料が求められている。そのため、従来の金属や導電性高分子電極に代わる生体親和性の高い電極、すなわち柔軟で体内に埋め込む安全性を有し、優れた物質透過性をもつハイドロゲル電極の開発は急務である。バクテリアセルロース (BC) はセルロースナノファイバー (CNF) からなり、99%以上の含水率を有する生体適合性ハイドロゲルに位置づけられる。本研究では、BC の CNF 表面を導電性ポリマーで選択的に被覆し、高導電性かつ高強度なハイドロゲル電極を開発した。

【実験】最初に、アクリロイル基導入 BC (AcBC) ゲル を作製した。次に、AcBC ゲルを *p*-スチレンスルホン酸ナトリウム水溶液に浸漬し、開始剤に過硫酸アンモニウム (APS) を用い、70°C で 24 時間反応させることで BC ゲルの CNF 表面にポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム) (PSS) をグラフト化した (BC-*g*-PSS)。その後、3,4-エチレンジオキシチオフェン (EDOT) の水-DMF (1:1) 分散液に浸漬し、酸化剤に APS を用い、室温で 48 時間反応させることで目的の導電性ハイドロゲル (BC-*g*-PSS/PEDOT) を得た。続いて、作製した BC-*g*-PSS/PEDOT ゲルの圧縮強度と導電率を測定し、加えて BC ゲルの CNF の積層構造を利用した導電率の異方性についても検討した。

【結果と考察】走査型電子顕微鏡 (SEM) により BC ゲルの CNF 表面が PEDOT/PSS 層で被覆されていることがわかった (**Figure 1**)。すなわち、グラフトされた PSS が EDOT の重合時のテンプレートとして機能していることが示唆された。4 端子法による導電率測定から、最大で 0.3 S/cm の高い導電率を示す一方で、含水率も 92%以上保持していた。持続長の長い CNF に沿って PEDOT/PSS を導入することで、高導電性かつ高含水率を達成した。BC ゲルは CNF からなるため、水の保持力が低く、非常に弱い応力による圧縮でも水を放出して収縮する。しかし BC-*g*-PSS/PEDOT ゲルの圧縮試験による力学強度評価では、圧縮歪み 90%における最大応力は BC ゲルの約 70 倍に向上し、PSS を導入することで BC ゲルの脆弱性を改善できた。また、BC ゲルの CNF の積層構造に由来した導電率の面依存性も確認した。

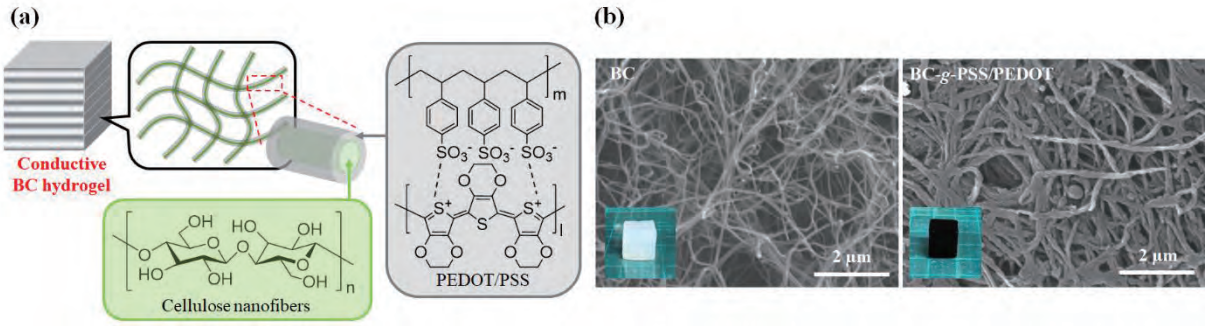


Figure 1. (a) Illustration and chemical structures of the present conductive hydrogel. (b) SEM images of BC (left) and BC-*g*-PSS/PEDOT (right) hydrogels.

Fabrication of gel electrodes with high water content consisting of conductive polymer coated bacterial cellulose nanofibers

Tatsuya HIGASHIGAKI, Taka-Aki ASOH and Hiroshi UYAMA
Department of Applied Chemistry, Osaka University
Tel: +081-6-6879-7365, FAX: +81-6-6879-7367, E-mail: t_higashigaki@chem.eng.osaka-u.ac.jp

2P-091

低侵襲的に剥離可能な歯科材料への応用を目指した光分解性ポリロタキサン架橋剤の合成

[1] 東京医科歯科大学　生体材料工学研究所　有機生体材料学分野
○三田北斗[1]、有坂慶紀[1]、田村篤志[1]、由井伸彦[1]

【緒言】　現在、歯列矯正用ブラケット装着のように撤去を前提とした歯表面への人工物の接着において、レジン系セメントのような高機械的強度の接着剤が使用されている。しかし、そのようなセメントは高い接着性をもつため、撤去時のエナメル質損傷が危惧されている。そこで、レジン系セメントの機械的強度を任意に調節可能な新規レジン系接着剤の構築を目指し、光分解性ポリロタキサン（PRX）に着目した。PRX は環状分子である α-cyclodextrin （α-CD）の空洞部に poly(ethylene glycol) （PEG）等の線状高分子が貫通した超分子であり、軸高分子中に分解性の結合を導入することで任意の刺激に対する分解応答性を賦与することが可能である。軸高分子中に導入した分解性結合が一カ所でも開裂することで、PRX 構造全体の崩壊が惹起される。よって、分解性 PRX を用いることで、分解性結合数を減らすとともに迅速な分解応答が期待される。本研究は PEG 鎖内部に光分解性基である *o*-ニトロベンジル基を有し、α-CD に *n*-ブチル基およびメタクリロイル基を修飾した光分解性 PRX 架橋剤を合成し、この架橋剤を溶解したレジンモノマーで硬化体を作製し、紫外光照射に伴う最大引張強度の変化を評価した。

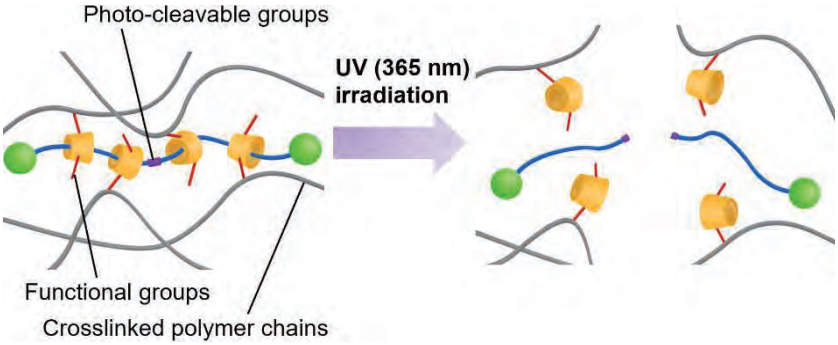


Figure 1 Schematic illustration for degradation of photo-cleavable polyrotaxane crosslinkers.

【実験】　*o*-ニトロベンジル基を内部にもつ光分解性 PEG と α-CD を水溶液中で 24 時間撹拌後、生じた擬ポリロタキサンの末端をアダマンタン誘導体で封鎖し光分解性 PRX を合成した。この PRX に波長 365 nm の紫外光を 5 分間照射後、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により光分解性を解析した。次に、光分解性 PRX の α-CD に *n*-butyl isocyanate と 2-isocyanatoethyl methacrylate を修飾し光分解性 PRX 架橋剤を合成した。レジンモノマーに(+/-)-camphorquinone、2-(dimethylamino)ethylmethacrylate、光分解性 PRX 架橋剤を加えて撹拌し、波長 465 nm の可視光を 2 分間照射して硬化体を作製した。この硬化体の最大引張強度は引張試験機（EZ-test）により測定した。

【結果および考察】　*o*-ニトロベンジル基を有した PEG と α-CD からなる光分解性 PRX を合成し、核磁気共鳴解析によりその構造を確認した。この PRX は紫外光（365 nm）照射により α-CD を放出し、分解したことが SEC 解析によりわかった。一方で、*o*-ニトロベンジル基をもたない非分解性 PRX は紫外光照射による分解が認められず、*o*-ニトロベンジル基の光開裂による PRX 構造の崩壊が示された。光分解性 PRX の α-CD にメタクリロイル基および *n*-ブチル基を修飾した光分解性 PRX 架橋剤はレジンモノマーに溶解し、可視光（465 nm）照射により硬化体を形成した。この光分解性 PRX 架橋剤硬化体の引張試験を行った結果、紫外光照射により硬化体の最大引張強度が低下することが明らかとなった。以上より、紫外光照射により機械的強度を制御しうる光分解性ポリロタキサン架橋剤を合成でき、撤去時の侵襲を伴わない歯科用接着剤への応用が期待できる。

Synthesis of photo-cleavable polyrotaxane crosslinkers for non-invasively detachable dental materials.

Hokuto Santa[1], Yoshinori Arisaka[1], Atsushi Tamura[1], Nobuhiko Yui[1]
[1]Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Tel: +81-3-5280-8020, Fax: +81-3 -5280-8027, E-mail: yui.org@tmd.ac.jp

2P-092

血液成分との相互作用における高分子濃縮層の効果

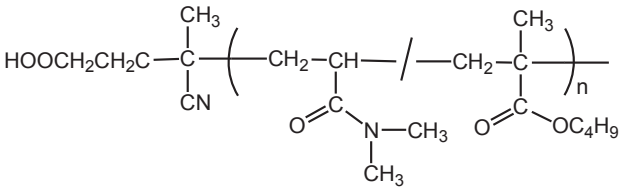
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
○舟木　健太・青木　隆史

生体内部では、細胞外は血液などの体液で満たされ、細胞内外はタンパク質などが高濃度に溶解した水環境である。細胞内外を隔てている生体膜は主にリン脂質から構成されており、極性の低い脂質部分が水環境から避けるように膜の内部に集まり、極性の高いリン酸エステル部位が水環境である膜の外側を向いて流動性を保持しながら二重層を形成している。すなわち、細胞の構造上の特徴は、タンパク質などの高濃度水溶液を覆った生体膜が動的な界面を持っていることである。

血液と接触するあらゆる人工臓器デバイスは固体状態であり、血液という液体とはその物性が大きく異なる。したがって、分子の運動性が異なる両者が接触した場合には、それぞれの運動性の違いを解消するために、固体表面の分子の運動性に合わせるように、水分子がその運動性を落として固体表面と相互作用する。さらに、水に溶解している溶質分子も、固体表面と相互作用し吸着する場合があり、固—液界面という特殊な環境により、これらの相互作用が誘発されている。われわれは、血小板などの血液細胞の接着やタンパク質の吸着を抑える固体表面を実現するためには、細胞が持っている動的な界面が必要であると考えている。

水溶性高分子の中には、高濃度になると高分子鎖同士が疎水性凝集を起こして、溶媒の水から相分離する場合がある。特に、高分子鎖が水分子と相互作用しながらもバルク水から液—液相分離し、コアセルベートを生成することがある。われわれは、このコアセルベート状態が、その内部の高分子鎖が水和した状態を保持していることから、高分子鎖の運動が維持され、バルク水に対して明確な界面を作り、界面も動的に運動している状態であると考え、この高分子濃縮層（コアセルベート）をモデル界面として利用し、この高分子濃縮層上での血小板接着について検討してきた。本研究では、水から相分離して高分子濃縮層を形成するポリマーとして、*N*,*N*-dimethyl acrylamide (DMAAm)と疎水性モノマーである *n*-butyl methacrylate (BMA)との共重合体を選び（スキーム１）、血液成分との相互作用の抑制について検証した。

4,4’-Azobis(4-cyanovaleric acid)をラジカル重合開始剤として用い、フリーラジカル重合法により片末端にカルボキシル基を有する DMAAm と BMA との共重合体(PDB)を合成した。また、血小板接着実験では、アミノ基を導入した PET 基板表面上に PDB 共重合体を化学修飾した。成人男性より採取し調製した多血小板血漿(PRP)をポリマー修飾基板に加え、37℃で 30 分静置した後、試料表面上に接着した血小板の個数と形態変化を観察したところ、17mol%の PDB 共重合体(PDB-17)が血小板の接着数において最も低い値を示した。PDB-17 が液—液相分離したポリマー濃縮層を形成し、血小板の接着を抑制したと言える。一方、タンパク質吸着により血小板が接着凝集することから、血液凝固作用の引き金となっている。タンパク質吸着を抑制することも、人工臓器などのデバイスを活用するために重要なファクターとなる。本研究では PDB 共重合体とタンパク質との吸着実験について検証した結果を報告する。



Scheme 1. Structure formula of a PDB copolymer

The effect of a polymer-concentrated layer on the interaction with blood components

Kenta FUNAKI, Takashi AOKI
Department of Biobased Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology
Tel & Fax: +81-75-724-7820, E-mail: t-aoki@kit.ac.jp

2P-093

ポリロタキサン/ゼラチンからなる伸縮性 *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発

[1] 東京大学大学院工学系研究科，[2] 東京大学大学院医学系研究科
○中野　剛志[1]，太田　誠一[2]，伊藤　大知[1, 2]

【緒言】
ハイドロゲルは医療分野において幅広く応用されており、中でも *in situ* でゲル化が可能なインジェクタブルゲルは、その低侵襲性から注目されている。医療用ハイドロゲルにおいて、伸縮性を持つ部位への適用の制限が課題となっている。よって、生体適合性を持つインジェクタブルな伸縮性ハイドロゲルの開発が求められている。我々は、ゲルへの伸縮性の付与が報告されているポリロタキサン(PR)と、生体適合性材料であるゼラチンに注目した。PR は、ひも状分子をシクロデキストリンに通して両端を留め、シクロデキストリンがスライド出来る状態で閉じ込めた分子である。本研究では、シクロデキストリン部位をジオール化した PR(PR-diol)とフッ化フェニルボロン酸(FPBA)を修飾したゼラチン(Gel-FPBA)を合成した。両者を混合することで、ジオール-ボロン酸間の架橋により、伸縮性を持つ生体適合性 *in situ* 架橋ハイドロゲルの作製を検討した(Fig.1)。

【実験】
2.1 プリカーサーポリマーの合成及び評価
グリシドールを用いて PR のシクロデキストリン部位中の水酸基をジオール化し、^{1}H NMR、^{13}C NMR で修飾を確認した。また、牛由来ゼラチンのアミノ基に対し、NHS 化した FPBA 反応させることで Gel-FPBA を合成し、^{1}H NMR、UV-Vis、FT-IR、TNBS アッセイにより修飾を確認した。

2.2 Gel-FPBA/PR-diol ハイドロゲルの作製及び評価
終濃度30 wt%の Gel-FPBA に対し、PR-diol をボロン酸とジオールの比で1:1(PR1eq.)、1:2(PR2eq.)となるように50℃で混合後、室温に冷却してゲルを作製した。コントロールとして Gel-FPBA のみでもゲルを作製した。得られたゲルを用いて、引張試験、動的粘弾性測定、膨潤分解試験を行った。

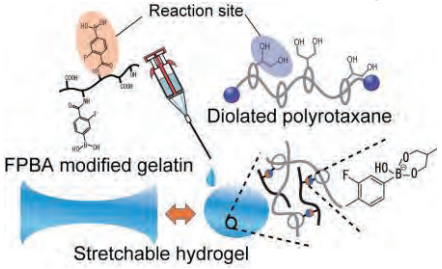


Fig.1 Schematic illustration of hydrogels composed of diolated polyrotaxane (PR-diol) and FPBA modified gelatin (Gel-FPBA)

【結果と考察】
3.1 プリカーサーポリマーの合成及び評価
PR-diol1の合成は、^{1}H NMR における3.2～3.8 ppm、^{13}C NMR における63～66 ppm のジオール由来のピークから確認された。^{1}H NMR の積分比より、修飾率は63.6 %と算出された。
Gel-FPBA の合成は、^{1}H NMR において7.3～7.6 ppm の FPBA 由来のピークから確認された。UV-vis では235、280nm に FPBA 由来のピークを確認し、FT-IR では3460~3400, 1680~1630, 1570~1515 cm^{-1}にアミド結合によるピークの変化を確認した。TNBS アッセイより修飾率を算出し、FPBA の当量によって5%~37%の範囲で修飾率を制御できることが確認された。

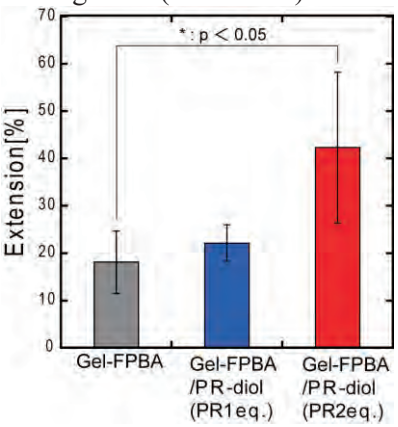


Fig.2 Comparison of the maximum extension of hydrogels.

3.2 Gel-FPBA/PR-diol ハイドロゲルの評価
両者を混合することで得られたハイドロゲルはゼラチンのみのゲルに比較して高い貯蔵弾性率を示し、溶媒に浸漬した際にも1.6倍程度高い膨潤度を示した。これにより、ジオール-ボロン酸間の架橋の形成が示唆された。また、引張試験において PR-diol を加えたゲルがゼラチンのみのコントロールに比べ、破断伸長比が有意に1.5~2倍程度向上する様子が観察された(Fig.2)。以上の結果から、PR を架橋させることによるゼラチンゲルの伸縮性向上が確認された。

Development of a stretchable *in situ* cross-linking hydrogel composed of polyrotaxane and gelatin
Takeshi Nakano[1], Seiichi Ohta[2], Taichi Ito[1 2]
[1]School of Engineering, The University of Tokyo [2]School of Medicine, The University of Tokyo
Tel: +81-3-5841-1425, Fax: +81-3-5841-1697, E-mail: taichi@m.u-tokyo.ac.jp

2P-094

酵素固定化ゲル微粒子を用いたミネラリゼーションシステムの構築

慶應義塾大学大学院理工学研究科
○小林　尚裕，福井　有香，藤本　啓二

【緒言】生物は特異的な微小環境を創り出し、生体分子の生成、その構造と活性の制御、生体反応の調節など精密に制御を行っている。骨代謝においては、破骨細胞が骨表面に接着して微小空間を創出し、酸と酵素反応によって効率的に骨吸収を行い、さらに骨芽細胞の分泌する基質小胞内部が微小反応場となり、骨の無機成分であるリン酸カルシウム(CaP)の生成(ミネラリゼーション)を調節している。本研究ではミネラル生成の環境を創出するために、柔軟性、付着性および化学的特性を有するゲル微粒子を担体として、それに反応因子として酵素の Carbonic anhydrase (CA) と Urease を組み込んだ。CA は CO_2 を H^+と HCO_3^-に変換する酵素であり、Urease は尿素を NH_3 と CO_2 に分解する酵素である。これら酵素をゲル微粒子に固定化し、酵素反応によって微粒子近傍に局所 pH 環境の創出を試みた。さらに、硬組織修復ツールとしての応用を見据えて、これら酵素固定化微粒子を用いて CaP の溶解および析出を試みた。

【実験】モノマーとして Methacrylic acid (MAc)、*p*-Nitrophenylacrylate (NPA)および *N,N'*-Methylenebisacrylamide (MBAAm) を用いて三元系沈殿重合を行い、活性エステル部位を有するゲル微粒子を作製した(MN 粒子)。この活性エステル部位を加水分解することで、カルボキシ基に富んだゲル微粒子を作製した(*h*MN 粒子)。次に、アミド縮合剤 DMT-MM を用いて *h*MN 粒子に CA と Urease をそれぞれ固定化した(*h*MN-CA 粒子、 *h*MN-Urease 粒子)。続いて、酵素活性評価として *h*MN-CA 粒子分散液に CO_2 を通じた溶液を加えて、H^+生成に伴う pH 変化を測定した。*h*MN-Urease 粒子については、尿素を添加し、NH_3 の生成に伴う pH 変化を検出した。次に、*h*MN-CA 粒子をガラス基板に配列化させて CaP 結晶を付着させた後に CO_2 を加えて、酵素反応によって CaP 結晶の溶解を試みた。一方、*h*MN-Urease 粒子については、Ca^{2+}とリン酸イオンの存在下で尿素を加えて、酵素反応に伴う CaP 結晶の生成を試みた。これら粒子近傍における CaP の溶解と析出の様子を走査型電子顕微鏡 (SEM)によって観察した。

【結果と考察】粒径 3.7±0.2 μm で負電荷(−14.8±0.9 mV)を有する *h*MN 粒子を作製し、CA の固定化を行い、固定化密度が 3.24 μmol/g-particle の *h*MN-CA 粒子が得られた。この粒子分散液に CO_2 溶液(4ºC)を加えたところ、pH の低下を促進することができた。この *h*MN-CA 粒子に CaP 結晶は強固に付着することがわかった。これは CaP と粒子表面のカルボキシ基との相互作用に起因すると考えられる。さらに、CO_2 を添加したところ、粒子周辺の結晶に多数のポアが観察された(Fig. 1)。これは粒子近傍の pH が低下したことによると考えられる。一方、*h*MN-Urease 粒子に尿素(pH 6、25ºC)を加えたところ、pH の上昇が確認された。この粒子に Ca^{2+}とリン酸イオンの存在下で尿素を添加したところ、粒子近傍の pH が上昇し、CaP 結晶の析出が観察された。これら酵素固定化微粒子は基質存在下で局所的に pH 環境を形成することができ、CaP の溶解と析出を誘導できるツールとなることが示唆された。

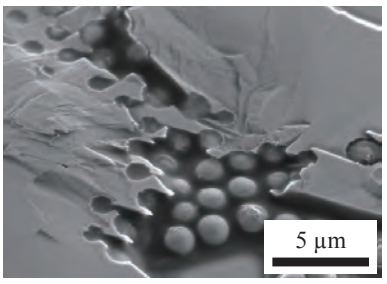


Fig. 1　Pore formation at the surface of a CaP crystal contacting with *h*MN-CA particles upon enzymatic reaction.

Development of Mineralization System by Using Enzyme-immobilized Gel Particles

Naohiro KOBAYASHI, Yuuka FUKUI, Keiji FUJIMOTO
Graduate School of Science and Technology, Keio University
Tel: 045-566-1580, Fax: 045-566-1551, E-mail: fujimoto@applc.keio.ac.jp

2P-095

Ti への Ag^+吸着による抗菌性付与

[1]名古屋大学大学院工学研究科，[2]名古屋大学未来材料・システム研究所，[3]北見工業大学地球環境工学科
○大脇　充裕[1]，黒田　健介[2]，興戸　正純[2]，山口　花帆[3]，大津　直史[3]

【緒言】
Ti は高強度・高靭性であり，優れた生体適合性を示すため生体材料として広く用いられている．しかし，単独では抗菌性に乏しいため，金属 Ag や Ag^+の添加などによる抗菌性の付与が試みられてきた．これまでに著者らは，Ti-Ag 合金に陽極酸化を施すことにより合金表面層に Ag^+を含む酸化皮膜を作製し，それが抗菌性能を発揮することを報告した．その一方で，金属イオンを含有する水溶液に，表面を高度に清浄化した Ti を浸漬することにより，Ti 表面に金属イオンが強固に吸着し，脱離しにくいことをすでに見出している．そこで本研究では，表面を清浄化した Ti を Ag^+を含む水溶液に浸漬することにより Ti 表面に Ag^+を吸着させ，その抗菌性能を調べるとともに，表面に吸着した各種イオンおよび表面の親水性が抗菌性能に与える影響を調べた．

【実験】
表面粗さ Ra/μm < 0.1 となるように湿式研磨を施した Ti 試料に，180 °C の蒸留水中で 3 h 水熱処理を施した後，試料を室温の大気中に最長 7 d 保存することで表面親水性を制御した． Ag^+，Na^+など各種イオンを含む水溶液に浸漬することでイオンを吸着させた後，蒸留水中で 5 min 超音波洗浄を行うことで Ti 表面に強固に吸着していないイオンを除去した．試料表面の表面粗さ Ra 測定（測定範囲 : 150×112 μm）にはレーザー顕微鏡を用い，表面親水性評価には水滴接触角（WCA）測定（滴下量 : 2 μL）を用いた．試料表面のイオンの存在の調査には XPS 分析を用いた．また，生体模擬環境下に保存した際の試料表面の Ag^+吸着量の変化および試料表面からの Ag^+放出性を調べるため，37 °C の PBS(-)中に 7 d 浸漬した試料について，XPS による試料表面の Ag^+吸着量の定量および ICP-AES による PBS(-)中への Ag^+の溶出量の定量を行った．また，試料の抗菌性能の評価として，JIS Z2801 に準拠して大腸菌および表皮ブドウ球菌を用いた抗菌性試験を行った．

【結果と考察】
処理後の試料表面はすべて Ra/μm < 0.1 のままであり，初期表面粗さを維持していた．XPS 分析の結果，Ag^+含有水溶液への浸漬後，十分な試料洗浄後の表面にも Ag^+が検出されたため，浸漬により Ti 表面に Ag^+が吸着しているものと考えられる．Ag^+の吸着量は初期 WCA に依存し，WCA の上昇とともに Ag^+吸着量が増大した．また，吸着した Ag^+は生体模擬環境下において脱離せず保持されていた．抗菌試験の結果，Ag^+が吸着した試料は抗菌性を示した（Fig. 1）．この結果から，Ag^+が放出されなくとも，表面に Ag^+が吸着していることにより抗菌性を示すことが明らかとなった．また，当日は試料表面に吸着した各種イオンおよび試料表面の親水性が抗菌性能に対して与える影響についても報告する．

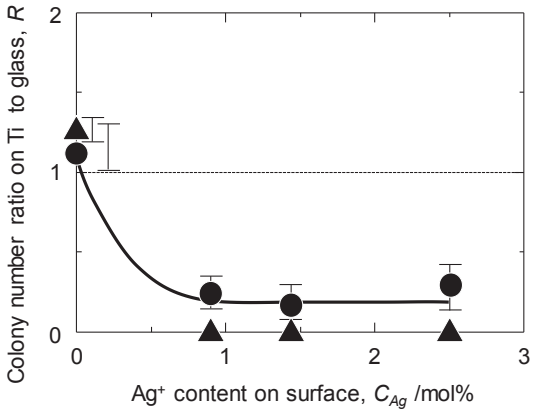


Fig. 1　抗菌性と Ag^+吸着量
▲ 大腸菌
● 表皮ブドウ球菌

Antibacterial properties of Ag^+ adsorped Ti

Mitsuhiro Owaki[1], Kensuke Kuroda[2], Masazumi Okido[2], Kaho Yamaguchi[3], Naofumi Ohtsu[3]
[1]Department of Materials Process Engineering, Nagoya University　[2]Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University　[3]School of Earth, Energy and Environmental Engineering, Kitami Institute of Technology　Tel: +81-52-789-3230, E-mail:oowaki.mitsuhiro@i.mbox.nagoya-u.ac.jp

2P-096

各種抗菌ナノ粒子のアナフィラキシー様反応惹起性の評価

[1] 近畿大学大学院生物理工学研究科
○梅田　晃治[1]，石丸　佳樹[1]，東　慶直[1]，古薗　勉[1]

【緒言】血管内留置カテーテル使用による細菌感染症は、重篤な病態悪化等を引き起こすことが懸念され、解決手段が求められている。しかしながら我が国では、クロルヘキシジン/スルファジアジン銀含侵カテーテルを用いた患者にアナフィラキシーショックが発生したことを発端として、抗菌カテーテルの使用に制限がかけられている。そこで我々は、カテーテルのコーティング材料として各種イオンをドープしたハイドロキシアパタイト(HAp)ナノ粒子の開発を行い、抗菌性制御について検討してきた。本研究では、各種抗菌ナノ粒子を用いて、アナフィラキシー(様)反応の程度を *in vitro* で検討を行った。

【実験】実験には各種イオン[フッ素(F)、亜鉛(Zn)、チタン(Ti)]をドープした HAp ナノ粒子を用いた。まず、各種抗菌ナノマテリアルおよびヒスタミンの遊離を促進する薬剤（compound48/80、グルコン酸クロルヘキシジン）をヒト肥満細胞(HMC-1)に添加し、ELISA 競合法を用いることで、HMC-1 から分泌されるヒスタミン濃度を定量した。その後、HAp 自身が本評価系の阻害因子となる可能性を検討するため、ヒスタミンデヒドロゲナーゼおよび ELISA 競合法を用い、ヒスタミンの normal-HAp(n-HAp)への吸着および n-HAp による HMC-1 に対する免疫反応の影響を検討した。

【結果と考察】各種抗菌 HAp ナノ粒子添加による HMC-1 からのヒスタミン分泌について評価した。ポジティブコントロールである compound48/80 およびグルコン酸クロルヘキシジンは高いヒスタミン分泌を誘導した。各種抗菌ナノ粒子を添加した場合、ヒスタミン分泌は細胞単独とほぼ同程度であった（Figure 1)。その後、ヒスタミンの n-HAp への吸着を検討した結果、n-HAp 添加の有無でヒスタミン標準液の吸光度に差が見られなかったため、ヒスタミンは HAp にほとんど吸着されないと考えられた。また、n-HAp による HMC-1 に対する免疫反応の影響を検討した結果、n-HAp 添加の有無で HMC-1 から分泌されたヒスタミン濃度に差異が認められなかった。以上より、HAp は本評価系に影響を与えないことが明らかとなった。これらの結果から、各種抗菌 HAp ナノ粒子はヒスタミン分泌を誘導しなかったため、アナフィラキシー(様)反応を惹起しにくいと考えられた。また、compound48/80 等では細胞膜受容体を介し、脱顆粒が生じることが報告されているが、各種抗菌ナノ粒子ではヒスタミンが過剰に分泌されなかったため、細胞膜受容体への刺激は微弱であることが推察された。以上のことから、これらの HAp ナノ粒子をカテーテルにコーティングすることにより、アナフィラキシー(様)反応を惹起しにくいデバイスの創出が期待される。また併せて、抗菌性に優れる銀ナノ粒子のヒスタミン放出試験を実施し、比較検討したので報告する。

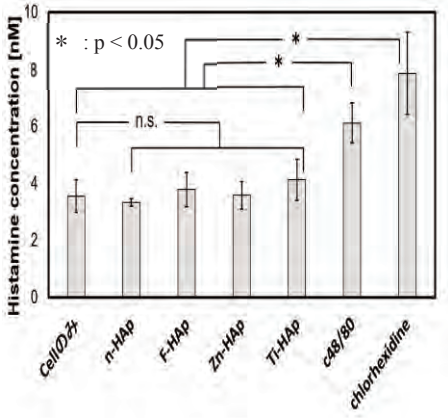


Figure 1. Anaphylactoid reaction test by measuring histamine concentration (n=3)
c48/80：compound48/80
chlorhexidine：chlorhexidine-gluconate

Evaluation of anaphylactoid reaction using various antibacterial nanoparticles

Koji Umeda[1], Yoshiki Ishimaru[1], Yoshinao Azuma[1], Tsutomu Furuzono[1]
[1]Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University
Tel: +81-736-77-3888, Ext: 5206, E-mail: furuzono@waka.kindai.ac.jp

2P-097

長時間安定に細胞膜を修飾できるグラフト型ポリマーの分子設計と精密合成

東京大学大学院工学系研究科
○Yum Jongmin，井上　祐貴，石原　一彦

【緒言】

ポリマーを用いる細胞表面改質は、多様な機能性官能基及び生理活性物質を細胞表面に固定することにより、再生医療、生体組織工学、免疫療法などの細胞治療分野で研究されている。細胞表面上のポリマー修飾は、共有結合、静電相互作用、疎水性相互作用を用いた方法がある。その中で、リガンド-受容体タンパク質間の相互作用によるポリマー修飾は、対応するタンパク質受容体特異的な結合性を持つことにより、位置および密度の制御や機能変換から有意義であると考えた。ここで、リガンド-受容体タンパク質間の相互作用する部分に注目して、ポリマー構造の観点から細胞膜との相互作用を解明することは重要な要素である。また、外部からの刺激により修飾したポリマーの構造や特性を変化させることで、この相互作用に関しても明確になると考えた。そこで、本研究では、多様な構造的パラメータを制御できるグラフト型ポリマーを用い、長時間安定に細胞膜表面に留まることができるポリマーを創製することを目的とする（図 1）。ポリマーに、細胞親和性、細胞膜タンパク質との結合性を付与するため、生体分子非認識特性を有するリン脂質ユニットからなり、ターゲットとなる細胞膜タンパク質としてインテグリンを、そのリガンド分子として Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD)を選択した。長時間安定に細胞膜を修飾できるポリマーの構造を、リガンド分子の数や運動性、グラフトポリマーの水環境下での溶存状態をパラメータとして決定する。

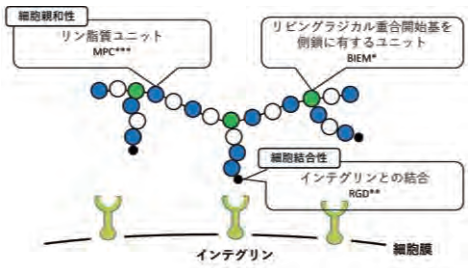


図 1　レセプターに特異的に反応するポリマーを利用した細胞膜の修飾

【実験】

1. 構造明確なグラフトポリマーの合成

RAFT 重合により、2-(2-bromoisobutyryloxy)ethyl methacrylate (BIEM)ユニットと 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC)からなるランダムコポリマー(PMBr)を合成した。合成した PMBr をグラフトポリマーの主鎖として用いることで、BIEM ユニットから ATRP 法により poly(MPC) (PMPC)を伸長させた(PMPC-graft-PMBr)。側鎖の PMPC の量体を 25、50、100 とした。

2. PMPC を用い、click chemistry 反応条件を検討

ポリマーの末端での官能基変換を検討するために、ATRP 重合法で合成した PMPC の末端臭素原子に対して、アジド化反応及びプロパルギルアミンを用いた Huisgen 環化付加反応を行った。

【結果と考察】

グラフトポリマー合成結果、グラフトポリマーの主鎖の転化率が高く、ポリマー中のモノマーユニット組成が仕組み組成に近いポリマーを得ることができた。また、側鎖の合成においては、MPC の転化率はほぼ 90 %であり、GPC 測定による得られた多分散度が低いことから、明確な構造を有するグラフトポリマーを合成することができた。

さらに、PMPC にアジド化反応した後、FT-IR 測定により、アジド基に由来するピークが観測できた。さらに、アジド化反応した PMPC の Huisgen 環化付加反応結果、加えるプロパルギルアミンの濃度を増やすと末端変換する割合が大きくなり、約 60%のポリマー末端のアジド基がアミノ基に変換された。講演では得られたグラフトポリマーでの細胞膜修飾に関しても報告する。

Molecular Design and Precision Synthesis of Graft Polymer Capable of Stable Modifying Cell Membrane for Long Time

Jongmin Yum, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara
Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
Tel: +81-03-5841-7128, Fax: +81-03-5841-8647, E-mail: yum@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

2P-098

両親媒性 MPC ポリマーブラシ表面の疎水性相互作用がタンパク質吸着に与える影響

東京大学大学院マテリアル工学専攻
○味寺克哉，井上祐貴，石原一彦

[緒言] タンパク質や細胞との相互作用を調節できるバイオマテリアル表面を作製することは生体に触れる医療デバイスを作製するために必要である。デバイス表面で誘起される細胞・組織レベルの生体応答はタンパク質吸着が発端となる。本研究では構造明確な親水性 - 疎水性の高密度ランダムコポリマーブラシを用いて原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定により、タンパク質の吸着に直結する分子間相互作用の観点からタンパク質の吸着過程を明らかにする。ポリマー表面で複雑に作用する分子間相互作用のうち疎水性相互作用力を高精度に解析する。表面上で働く分子間相互作用力を定量的に解析することで、各表面へのタンパク質の吸着挙動およびそれに起因する細胞接着を制御できるバイオマテリアル表面構造の設計指針の提案につながる。

[実験] 表面の親水・疎水状態を制御するために、表面開始型原子移動ラジカル重合(SI-ATRP)により、Si 基板上に 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)および *n*-butyl methacrylate (BMA)からなる構造明確なランダム型ポリマーブラシ表面を構築し、表面特性を解析した。fibronectin を固定化したカンチレバーとポリマーブラシ表面とのフォースカーブ測定を行うことで、タンパク質の吸脱着時に生成する疎水性相互作用力を解析した。また Quartz crystal microbalance (QCM)を用いて測定されたタンパク質吸着量との関連性を調べた。

[結果と考察] 表面元素、接触角、表面電位および膜厚測定より種々のポリマーブラシ層が構築されたことが示された。Fig.1 に各ポリマーブラシ表面と fibronectin の分子間相互作用力と吸着量を示す。AFM による相互作用力測定から、MPC ユニット組成が 0 %、10 %のポリマーブラシ表面で、カンチレバーの離脱時のみ引力が測定され疎水性相互作用力は自由拡散した疎水基を持つ分子の接触後に初めて働くことが示され、接触角によって推定される表面自由エネルギーに依存することが示された。fibronectin 吸着量と相互作用引力には正の相関関係があった。fibronectin 吸着量は、ポリマーブラシ表面との疎水性相互作用力に強く影響を受けることが示された。

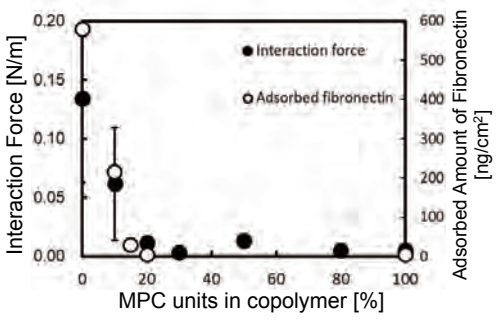


Fig. 1. ポリマーブラシ層の MPC ユニット組成と fibronectin との相互作用力、吸着量の関係

The effect of hydrophobic interaction force on protein adsorption using amphiphilic copolymer brush layer

Katsuya MITERA, Yuuki INOUE, Kazuhiko ISHIHARA
Department of Materials Engineering, The university of Tokyo

2P-099

焼結条件による多孔質チタンの加工特性と評価に関する研究

[1] 大分工業高等専門学校専攻科　機械環境システム工学専攻，　[2] 大分工業高等専門学校　機械工学科
○岩田　隆正[1]，坂本 裕紀[2]

【緒言】現在の歯科医療では，インプラントの材料としてチタンが使われている．チタンが生体材料として用いられる理由には，人体に無害で組織適合性も良いなどの点が挙げられる．しかし，チタンをそのまま人体に使用すると様々な問題点も出てくる．その一つに弾性係数の違いがある．純チタンの弾性係数は 105～110GPa，人骨の弾性係数は 17～20GPa となっている．ここに生じた弾性係数の差をなくすために，多孔質化という手段が用いられる．多孔質化とは直径 100～125μm ほどの粉末状にしたチタンに放電プラズマ焼結を施し，結合させる方法である．この操作により，チタン粒同士の結合の隙間に気孔が生まれ，弾性係数を人骨に近づけることが可能である．さらにこの気孔に骨組織が侵入することで，チタンと骨の強固な結合も可能である．

本研究では，歯科インプラントに使用できる多孔質チタンを作成するため，焼結条件によるさまざまな特性の違いをまとめ，気孔率，SEM による表面観察，圧縮試験，ねじ切り加工による加工特性によって評価することを目標とする．

【実験】プラズマ放電焼結機を用いて焼結条件の違う 5 種類の多孔質チタンを作成した．各焼結条件の多孔質チタン試料をそれぞれ複数個抜粋し，圧縮試験を行った．また，SEM を用いて多孔質体の結合状態を確認し，粒同士の結合の仕方，気孔の様子などの焼結条件の違いによる結合状態の差を観察した．さらに，NC 旋盤によるねじ切り加工を施し，各条件の加工特性を切削時の状態やマイクロスコープ，SEM による観察から評価した．試験片を牛骨に埋め込み，圧縮試験や疲労試験なども行う．

【結果と考察】圧縮試験では，圧縮強度には保持時間が大きく影響していることが分かり，保持時間を長くすることによって，硬さが向上する性質も見られた．縦弾性係数は気孔率と関係することから，気孔率を下げることにより圧縮強度を高くできることが確認できた．さらに縦弾性係数を向上させるには焼鈍などの熱処理があり，より人骨に近づけることが可能であると考えられる．SEM 観察では，気孔率による見た目の大きな違いは見られなかったが，結合痕のクレーターのサイズを測定することで，結合度と圧縮力の関係が明らかになった．粒同士をより強く結合させるためには，圧縮力を上げなければならないが，気孔率の低下も考え，条件を検討しなければならない．ねじ切り加工では，条件により目つぶれが発生した．圧縮力が高かった条件に特に目つぶれが多く見られた．これは圧縮力と気孔率に関係しているが，切削の条件を変更することで改善される可能性があると考えられた．今後は，切削の条件に関しても目つぶれが発生しないように設定していく必要がある．

Study on processing characteristics and evaluation of porous titanium by sintering condition

Takamasa Iwata[1], Yuki Sakamoto[2],
[1]Mechanical and Environmental Systems Engineering Major, National Institute of Technology, Oita College
[2]Department of Mechanical Engineering, National Institute of Technology, Oita College
Tel: +81-97-552-6879, Fax: +81-97-552-6975, E-mail: ysak@oita-ct.ac.jp

2P-100

歯科において実際に用いられるインプラントの製作と評価に関する研究

[1] 大分工業高等専門学校専攻科　機械・環境システム工学専攻，[2] 大分工業高等専門学校　機械工学科
○佐藤　諒弥[1]，坂本　裕紀[2]

【緒言】
純チタン及びチタン合金は，軽量かつ人体に無害で組織適合性が良いため，現在歯科インプラントや人工骨などの生体内でよく用いられている．しかし，チタンと骨の弾性係数が異なることから（チタン：105～110GPa，人骨：17～20GPa），ストレスシールディングが発生し人口骨周辺の骨が痩せてしまうことや，骨とインプラントが直接結合しにくいことが問題となっている．
そこで、チタンを多孔質化することでチタンを人骨の弾性係数に近づけることができるほか，チタンの表面積が増加することと，気孔の中に骨が浸透することで，インプラントと骨が強固に結合することが期待されている．
しかし，多孔質チタンをインプラントに用いるには強度，弾性係数が不足している状態であり，それらの改善が求められている．
したがって，本研究では多孔質チタンの強化のために，放電プラズマ焼結を施し，試料を作る際の条件を変更し，インプラント製作に最適な強度と多孔性を有する多孔質チタンの選定を行った．そして，焼鈍することで強化した多孔質チタンとの物性の比較を行った．さらに，多孔質チタンの低い弾性係数を改善するために，緻密なチタンと多孔質チタンを複合した材料の製作，評価を行った．

【実験】
多孔質チタンの試料は，100～125μmのチタン粉末を放電プラズマ焼結することで製作した．強度向上のためにSPSを行う際の圧縮力と保持時間を変更し3種類の試料を製作した．
多孔質チタンの弾性係数向上のために試料の中央部に緻密なチタンの軸を有した多孔質チタンの製作を試みた．複合材料の製作方法は，予め材料の芯となる部分を緻密なチタンで製作し，それをカーボンダイスの中に設置する．その芯を覆う形でチタン粉末を投入し放電プラズマ焼結を行うことで製作した．
以上の多孔質チタンの試料と複合材料の試料を圧縮試験やSEM観察を行い評価した．

【結果と考察】.
複合材料の加工をする際は，多孔質部が脆く旋盤での加工が困難な部分があったため研磨をすることで調整した．
SEM観察の結果から放電プラズマ焼結を行う際の保持時間の延長と圧縮力の増加は，両方ともに多孔質チタンの圧縮強度向上に有効であることが分かった．また，今回製作した試料の圧縮強度は，焼鈍を行った試料の圧縮強度には及ばなかったが，更に放電プラズマ焼結の条件を変更することで多孔質チタンの強化を期待できる．
また，気孔率との相関を見てみると，圧縮力を上げた際は保持時間を長くした際より気孔率が下がっている．多孔質チタンは強度が高く気孔率が大きいものが生体材料として最適である．従って，今後多孔質チタンを製作する際は，保持時間をさらに延長したものを作るべきであると考えられた．

Study on production and evaluation of the implant which is really used in dentistry

Ryouya Satou[1], Yuki Sakamoto [2]
[1]Mechanical and Environmental Systems Engineering Major, National Institute of Technology, Oita College
[2]Department of Mechanical Engineering, National Institute of Technology, Oita College
Tel: +81-97-552-6879, Fax: +81-97-552-6975, E-mail: ysak@oita-ct.ac.jp

2P-101

Au–Nb 合金への Ti，Zr 添加による磁化率，硬さへの影響

[1]徳島大学大学院 生体材料工学分野，[2]徳島大学大学院 歯科放射線学分野
○宇山　恵美[1]，誉田　栄一[2]，浜田　賢一[1]

【緒言】血管拡張ステントや脳動脈瘤クリップといった金属製デバイスが生体内に存在すると、磁気共鳴画像法（MRI）による撮影時に、金属製デバイスを起因とした偽像（アーチファクト）が生じる。これにより金属製デバイス周囲組織の正確な画像情報が得られず診断に支障をきすといった問題が、MRI の高磁場化にともない深刻化している。そこで，MRI 撮影時にアーチファクトを生じない合金として、生体とほぼ同じ磁化率-9 ppm かつ高硬度を示す Au 合金の研究・開発を進めている。これまでに研究してきた Au 合金のうち、Au-Nb 合金は Au_2Nb（磁化率-23 ppm）析出により磁化率が減少するため、熱処理によって磁化率の調節可能で、かつ Au_2Nb の析出により硬さが向上することが明らかとなった。また，Au-Ti 合金や Au-Zr 合金は、Au に少量添加するとそれぞれ Au_4Ti、 Au_4Zr が析出し、磁化率の変化はわずかだが、硬さが飛躍的に向上することが分かった。そこで、本研究では Au-Nb 合金に第３元素として Ti および Zr を添加した合金 Au-Nb-Ti 合金、Au-Nb-Zr 合金が、磁化率-9 ppm を示しつつ高硬度が得られるか調べた。

【実験】Au-12Nb-1.5Ti 合金（mass%、以下同じ）、Au-12Nb-1.5Zr 合金をアルゴンアーク溶解で作製し、1000℃にて 1 週間均質化処理を施した。その後、インゴットを大気中にて 300℃で熱間圧延し、溶体化処理を 1000℃にて 20 時間行った。その後、600℃、800℃で 0.5～20 時間時効処理を行い、磁化率、ビッカース硬さ、相構成を調べた。

【結果と考察】磁化率を Fig 1、ビッカース硬さを Fig 2 に示す。Au-12Nb-1.5Ti 合金の相構成は、溶体化処理後は単相で、時効処理後は Au_2Nb（磁化率-23 ppm）、Au_4Ti（磁化率 0）が析出した。600℃、800℃処理後はともに磁化率は低下し、-9 ppm を示しうることが分かった。また、ビッカース硬さは析出硬化により向上した。Au-12Nb-1.5Zr 合金の相構成は、溶体化処理後は単相で、時効処理後は Au_2Nb、Au_4Zr（磁化率-17 ppm）が析出した。磁化率は、800℃処理後では Au-12Nb-1.5Ti 合金と同様に低下したが、600℃処理後では増加し、Au-12Nb-1.5Ti 合金とは異なる挙動を示した。析出物の磁化率が負であるにもかかわらず、合金全体の磁化率が増加するメカニズムについては今後解明する必要がある。また、ビッカース硬さは Au-12Nb-1.5Ti 合金より低い値を示したが、Au-12Nb 合金より向上した。ここで、磁化率および硬度は析出物とその量に依存すると考えられ、Au-12Nb-1.5Ti 合金の Ti と同等の mol%相当を示すのは Au-12Nb-3Zr 合金であるが、この合金は脆く圧延困難で実用合金に適さないことが分かった。よって、Au-Nb-Ti 合金は Au-Nb-Zr 合金と比較して、圧延性と高硬度の両立が可能であるといえる。

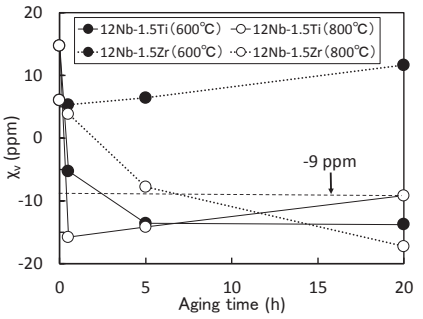


Fig 1：磁化率

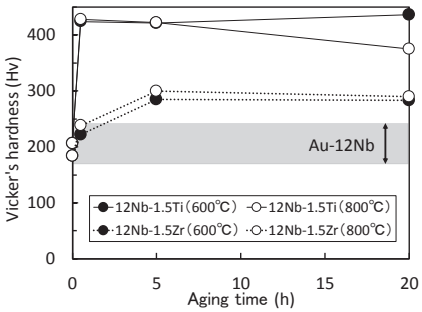


Fig 2：ビッカース硬さ

Effect of Ti and Zr addition on suceptibility and hardness of Au-Nb alloy

Emi Uyama[1], Kenichi Hamada[1], Eiichi Honda[2]
[1]Department of Biomaterials and Bioengineering, Tokushima University Graduate school, [2]Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Tokushima University of Graduate school
Tel: +81-633-7333, Fax: +81-633-9125, E-mail: uyamanikofu@tokushima-u.ac.jp

2P-102

細胞カプセル素材の開発

味の素株式会社　イノベーション研究所
○大角　幸治、藤井　友博、岡松　順子、北原　吉朗

【緒言】ホルモン欠損性疾患の治療のために細胞カプセルを移植する治療が始まっている。他家細胞を移植する際には、細胞をホストの免疫から保護するために透過性カプセル等に包む必要がある。現在、ブタ膵臓細胞をマイクロカプセルに封入した製品が糖尿病治療用にロシアで上市されている。この製品は 3 層から成り、第 1 層はブタ膵臓細胞をアルギン酸で包んでおり、第 2 層はポリオルニチンによりカプセルの膨張を防ぎ、第 3 層はアルギン酸によりホストからの免疫反応を防いでいる。カプセルからはインスリンがグルコース濃度依存的に分泌され糖尿病の治療に有効であるが、カプセルが膨張しやすい、異物反応による線維化が起きるなどの課題が明らかになっている。我々は、耐久性に優れ、かつ異物反応の起きにくいマイクロカプセルの作成を目的に本研究を開始した。

【実験】マイクロカプセルの強度を向上させる目的で、アルギン酸（Wako 社製 No.192-09995）にシステインをアミド結合させた。システインは自然酸化により S-S 結合を形成するためカプセルの強度向上が期待できる。合成したアルギン酸―システインを 100mM CaCl2 溶液に滴下して、アルギン酸―システインカプセル（Alg-Cys）を作成した。Ellman 法によってマイクロカプセル内の SH 基を定量し、時間経過と共に S-S 基が生成することを確認した。低カルシウム条件下（クエン酸添加、EDTA 添加、生理食塩水）におけるマイクロカプセルの耐久性評価も行った。次いで、異物反応を抑制する目的で異物反応抑制低分子（Nature Biotechnology, 34(3),p345, 2016）をマレイミドを介してカプセル表面に結合させた。得られた修飾マイクロカプセル（Alg-Cys-L）について生理食塩水条件下での耐久性を評価した。アルギン酸カプセル(Alg), 修飾マイクロカプセル（Alg-Cys-L）を C57BL マウスの皮下に移植して 28 日後に取り出し、カプセルの形状、カプセル表面での異物反応について評価を行った。

【結果と考察】アルギン酸―システインを CaCl2 溶液に滴下して作成したカプセル(Alg-Cys)は、低カルシウム条件下でも優れた耐久性を示した。一方でアルギン酸カプセル(Alg)ではカプセルの膨張、溶解が認められた。S-S 結合の形成により、Ca のキレート作用が失われてもマイクロカプセルは球形を維持できることが明らかになった。また、修飾マイクロカプセル(Alg-Cys-L)は C57BL マウスに皮下移植後、28 日目でも球形かつ透明であった。一方で、アルギン酸カプセル(Alg)は 28 日後ではマイクロカプセルの形状が崩れていた。Masson Trichrome 染色の結果、修飾マイクロカプセル（Alg-Cys-L）はアルギン酸カプセル(Alg)に比べて、移植後 14 日の時点では線維化の遅延が認められた。異物反応抑制低分子の効果により異物反応の進行が抑制されたと考えられた。我々が設計した修飾マイクロカプセル（Alg-Cys-L）は既存カプセルに比べて耐久性に優れ、かつカプセル表面での異物反応も抑制されていた。

Development of new material for cell encapsulation

Koji Ohsumi, Tomohiro Fujii, Yoriko Okamatsu, Yoshiro Kitahara
INSTITUTE FOR INNOVATION, AJINOMOTO., INC.
Tel: +81-44-210-5864, Fax: +81-44-210-5874, E-mail: koji_ohsumi@ajinomoto.com

2P-103

血管内皮細胞増殖因子捕捉型 RNA アプタマー修飾材料の性能評価

[1]国立医薬品食品衛生研究所，[2]株式会社リボミック，[3]東京大学医科学研究所
○森下　裕貴[1]，野村　祐介[1]，福井　千恵[1]，中村　義一[2,3]，葩島　由二[1]

【緒言】RNA アプタマーは、抗体に代わる標的認識が可能な次世代分子として期待されている。RNA アプタマーは化学合成可能であることから、医療機器分野に応用できれば、抗体や成長因子等を固定化した材料と比較して、コスト、安全性、品質管理等の点で優れた機能性材料が創成できる可能性が高い。本研究では、埋植部位への血管内皮前駆細胞の遊走や血管新生を促進可能な医用材料の開発を目指し、活性を保持した状態で血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を選択的に捕捉する RNA アプタマーを修飾した材料を作製し、その機能を評価した。

【実験】$VEGF_{165}$ を標的とした試験管内選択法によりアプタマー候補 RNA を選定後、最適化した RNA アプタマー（42mer）を取得した。当該アプタマーの VEGF ファミリーとの交差性及び RNA アプタマー/$VEGF_{165}$/VEGF 受容体三者複合体形成能は表面プラズモン共鳴法により評価した。三者複合体形成時の $VEGF_{165}$ 活性は、ヒト臍帯静脈内皮細胞に RNA アプタマーと $VEGF_{165}$ の混合溶液を添加した際の細胞増殖を指標として WST アッセイにより評価した。$VEGF_{165}$ 捕捉能は、RNA アプタマーを固定化した金板を作製し、$VEGF_{165}$ 添加血清中でインキュベート後、金板表面に吸着した $VEGF_{165}$ を回収し、ELISA により定量した。

【結果と考察】表面プラズモン共鳴法による解析の結果、取得した RNA アプタマーは、RNA アプタマー/$VEGF_{165}$/VEGF 受容体複合体を形成可能であることが明らかとなった。また、ランダム配列 RNA と比較して、ヒト $VEGF_{165}$、齧歯類 $VEGF_{164}$ へ高い結合性を有す一方で、ヒト $VEGF_{165b}$ には高い結合性を示さないことが確認された。これらの結果から、RNA アプタマーは、齧歯類を用いて in vivo での機能評価が可能であること、血管新生活性を持つ $VEGF_{165}$ スプライスバリアントのみを捕捉可能であることが判明した。WST アッセイによる解析の結果、ヒト臍帯静脈内皮細胞に RNA アプタマーと $VEGF_{165}$ を共添加しても、$VEGF_{165}$ 単独添加時と比較して、細胞増殖率は変化しなかったことから、当該 RNA アプタマーは、活性を保持した状態で $VEGF_{165}$ を捕捉可能であることが明らかとなった。RNA アプタマーを固定化した金板上への $VEGF_{165}$ 吸着挙動を評価した結果、未修飾の金板や、核酸修飾の対照として poly dT を固定化した金板と比較して、$VEGF_{165}$ の吸着量が有意に増加することが確認された（図 1）。今後、RNA アプタマー修飾材料の in vivo における有効性を評価していく予定である。

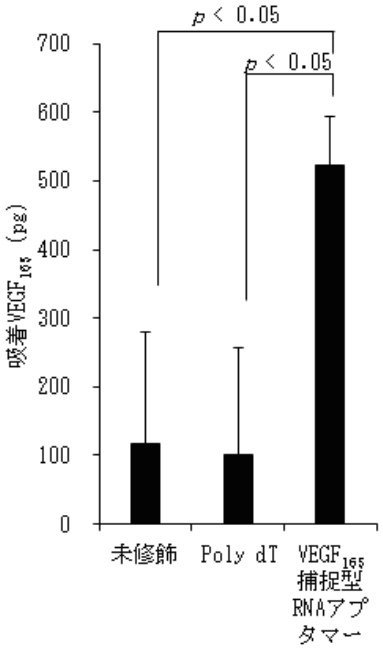


図 1. $VEGF_{165}$ 捕捉型 RNA アプタマーを固定化した金板上への $VEGF_{165}$ 吸着挙動

Performance evaluation of an RNA aptamer-modified biomaterial capturing vascular endothelial growth factor

Yuki Morishita[1], Yusuke Nomura[1], Chie Fukui[1], Yoshikazu Nakamura[2,3], Yuji Haishima[1]
[1]National Institute of Health Sciences, [2]Ribomic Inc., [3]Institute of Medical Science, University of Tokyo
Tel: +81-44-270-6540, Fax: +81-44-270-6611, E-mail: haishima@nihs.go.jp

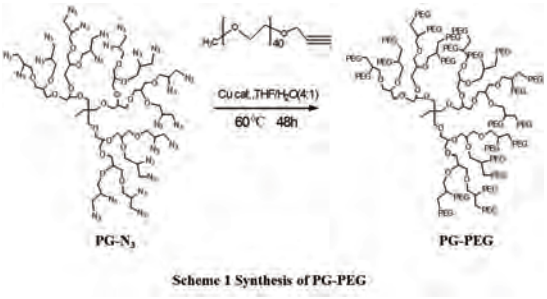
2P-104

コアーシェル型の新しい抗血栓性材料の合成と評価

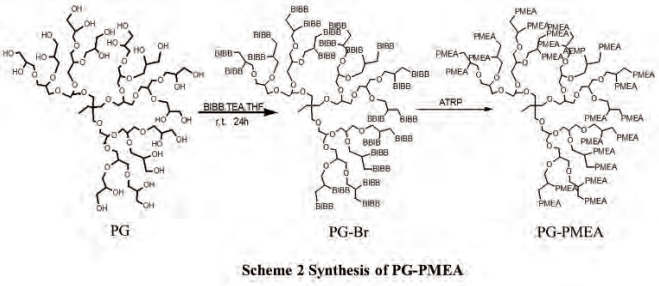
[1] 山形大学大学院理工学研究科　バイオ化学工学専攻，[2] 九州大学先導物質化学研究所
○佐藤　力哉 [1]，阿部　雅大 [1]，菅沢　杏子 [1]，菅原　なつみ [1]，田中　賢 [2]

【緒言】コアーシェル型高分子材料は、分子量が大きくても各種溶媒に対する溶解性に優れていることが知られている。そこで本研究では、コアに各種分野で応用研究されている Polyglycidol（PG）を用い、シェルとして高い血液適合性を示す Poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)や Polyethylenglycol(PEG)を、PG の末端水酸基の反応性を利用して導入した２種類の新規高分子材料(PG-PEG および PG-PMEA)を合成し、それらの抗血栓性を評価することを目的とした。

【実験】
Trimethylolpropane (TMP)を開始剤として用いて、2-propenylchloride，OsO_4 との反応を三度繰り返すことによりコアの分岐構造を制御した PG の合成を行った。PG-PEG の合成では末端水酸基のトシル化、アジド化を行った後、エチニル基をもつ Polyethylenglycol monomethylether とのクリック反応により PG 末端へ PEG の導入を行った。(Scheme1) 次に、PG-PMEA の合成では ATRP により PG 末端へ PMEA 構造を導入した。(Scheme2) 生成ポリマーの水との接触角、DSC による中間水の測定また血小板粘着試験等により血液適合性を評価した。



Scheme 1 Synthesis of PG-PEG



Scheme 2 Synthesis of PG-PMEA

【結果と考察】
PG-PEG の構造は ^{1}H-NMR による解析から確認した。DSC による中間水の測定から、生成ポリマー中に、中間水の存在が確認できた。水との接触角および抗血栓性評価においては、生成ポリマーが水溶性であったため有用なデータを得ることができなかった。また PG への PMEA の導入は ^{1}H-NMR による解析から、一本鎖当たり最大 32 程度の重合度であることが確認できた。ここで得られたポリマーと原料の PG との水の接触角を比較したところ、PG に比べ、生成したポリマーの水との接触角が大きくなったことからポリマー表面に PMEA が分布していることが示唆された。また DSC による中間水の測定から、生成ポリマー中に中間水の存在が確認できた。さらに生成ポリマーを用いたタンパク質吸着試験および ELISA 法による Fbnγ 鎖の活性評価では PMEA 単体に比べても優れた結果となった。
本発表ではこれらの詳細について報告する。

Synthesis and Characterization of Novel Core-Shell Type Antithrombogenitic Materials

Rikiya Sato[1], Masahiro Abe[1], Kyoko Suganuma [1], Natsumi Sugawara[1], Masaru Tanaka[2]
[1]Graduate School of Science and Engineering,Yamagata University
[2]Institute for Materials Chemistry and Engineering Soft Materials Chemistry, Kyushu University
Tel: +81-238-26-3087, Fax: +81-238-26-3177, E-mail: riki@yz.yamagata-u.ac.jp

2P-105

空気非接触/拍動循環型閉鎖系回路による高分子材料の血液適合性評価

[1]国立医薬品食品衛生研究所医療機器部,[2]日本医療研究開発機構,[3]東京大学大学院工学系研究科,[4]早稲田大学理工学術院先進理工学研究科,[5]九州大学先導物質化学研究所
○宮島敦子[1],小森谷薫[1],比留間瞳[1],野村祐介[1],森下裕貴[1,2],加藤玲子[1],井上祐貴[3],鮫島啓[4],松橋祐輝[4],青山祐介[4],熊谷直紀[4],保延慶紀[4],頼卓然[4],平井晴香[5],小林慎吾[5],田中賢[5],岩﨑清隆[4],石原一彦[3],葩島由二[1]

【緒言】インプラント型の循環器系医療機器では、長期間に渡って血栓形成等を起こさないことが要求されるが、血栓性評価法は未だ国際的に整合されていない。血栓性試験については、血液凝固系、血小板系及び補体系因子に関連する評価マーカが例示されているが、具体的な試験方法が記載されていないと共に、各マーカの有用性も未知な部分が多い。現在までの研究により、我々は、開放実験系において、高分子材料の血液適合性評価マーカとして血液凝固系因子（TAT）及び血小板系因子（β-TG, PF4）が有用であることを見出した。
本研究では、空気非接触/拍動循環血液回路を利用した閉鎖実験系により、中間水量の異なる新規高分子材料の血液適合性をこれらのマーカを指標として評価し、開放実験系の試験結果（第39回大会:2P-045）と比較検討した。
【実験】高分子材料として、PMEA, PEt2A, PMC3A, PEtEA, PEt2MA, PBuA, PEA, PMC6A, PEtEMA及びPMPC（陰性対照）を用いた。拍動循環閉鎖系血液回路は、拍動ポンプ、リザーバー、逆流防止弁及び延長チューブをコネクタで接続した内容量55 mLの回路で、内面を高分子材料で各々コーティング後、回路内部をヒト全血で満たし、拍動下で37℃、1時間循環させた。血液サンプルは、採血直後、回路組み立て開始時、拍動循環開始1分後及び1時間後に回収し、評価マーカ毎(TAT, β-TG, PF4)に適切な阻害剤処理を行った。各評価マーカ量はELISA法により測定した。
【結果と考察】各高分子材料で内面コートした閉鎖系回路にて、血液を循環開始1分後及び1時間後におけるTAT、β-TG及びPF4の量はほぼ等しく、材料と血液が接触を開始した回路組み立ての間に既に評価マーカの変動が生じていると考えられた。各マーカ値の変動量に基づき、高分子材料は血液適合性良好群（PMEA, PEt2A, PMC3A, PEt2MA）と不良群（PBuA, PEA, PMC6A, PEtEMA）に大別された。開放実験系における試験結果と比較すると、評価マーカの発現量はいずれも開放系が高く、TATで平均59倍、β-TGで16倍、PF4で5倍であった。開放実験系では、反応開始時に比べてシート非浸漬の対照群でもβ-TG、PF4の値が大きく上昇していたことから、両実験系における評価マーカ発現挙動の差異は、シート切断面の存在及び空気接触の有無に基づく血小板活性化度の相違等に由来すると考えられた。PEtEAは、閉鎖系循環開始1分後の評価マーカ値が中程度であったが、1時間後には高値を示し、血液適合性不良群に分類された。PEt2MAは、過去に実施した開放実験系において血液適合性不良群に分類されたが、今回実施した閉鎖実験系では血液適合性良好群に分類された。PEt2MAの血液適合性については更なる検証が必要であるが、少なくとも開放実験系では偽陰性は観察されなかった。閉鎖系と比較して、開放実験系は操作性に優れており、試験に要する被験材料量及び血液量も少なく、複数の被験材料を同時に評価できる利点もあることから、高分子材料の血液適合性を評価する簡易スクリーニング法として有用であると考えられる。しかしながら開放実験系で偽陽性となる可能性があることから、状況に応じて空気非接触/拍動循環血液回路実験系での検証を考慮する必要があると考えられる。

Evaluation of the blood compatibility of polymers using a closed pulsatile circuit system

Atsuko Miyajima[1], Kaoru Komoriya[1], Hitomi Hiruma[1], Yusuke Nomura[1], Yuki Morisita[1,2], Reiko Kato[1], Yuuki Inoue[3], Kei Sameshima[4], Yuki Matsuhashi[4], Yusuke Aoyma[4], Naoki Kumagai[4], Yoshinori Honobe[4], Zhouran Lai[4], Haruka Hirai[5], Shingo Kobayashi[5], Masaru Tanaka[5], Kiyotaka Iwasaki[4], Kazuhiko Ishihara[3], Yuji Haishima[1]
[1]Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, [2]Japan Agency for Medical Research and Development, [3]School of Engineerring, The University of Tokyo, [4]Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, [5]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University.
Tel: +81-44-270-6544, Fax: +81-44-270-6545, E-mail: miyajima@nihs.go.jp

2P-106

フロキュレーションによるセルロースナノファイバーと細胞の自己組織化

[1] 物質・材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点，[2] 山形大学有機材料システム研究推進本部，[3] 京都大学化学研究所
○吉川　千晶[1]，干場　隆志[2]，榊原　圭太[3]，辻井　敬亘[3]

【緒言】
私たちの研究グループでは植物細胞壁から単離されるセルロースナノファイバー（CNF）の物理特性（高弾性・高強度）、圧倒的資源量（安価に入手可能）、生体適合性に着目し[1]、これを用いた足場材料の開発に注力している。本研究では CNF 表面にアニオン性濃厚ポリマーブラシ(CPB)を付与し、フロキュレーションによる細胞との自己組織化を企図した[2]。
具体的にはグラフト密度の異なるアニオン性ポリマーを CNF 表面にグラフトし、グラフト密度や CNF 濃度が細胞とのフロック（凝集塊）形成や細胞機能に与える影響について検討した。

【実験】
表面開始原子移動ラジカル重合（SI-ATRP）の開始基をエステル化反応により CNF へ導入した(CNF-Br)。ここでは反応時間を変えることで開始基密度（DS）を調整した。DS は元素分析およびフーリエ変換型赤外分光測定(FT-IR)により決定した。次に、SI-ATRP により CNF に poly(p-styrenesulfonic acid sodium salt) (PSSNa)をグラフトした。重合後、フリーポリマーの分子量、分子量分布をゲルパーミエーションクロマトグラフィー測定により決定した。グラフト量は元素分析および FT-IR により決定し、フリーポリマーの分子量を用いてグラフト密度を算出した。得られた PSSNa 付与 CNF は肝細胞モデル(HepG2)と共培養し、フロック（凝集塊）形成を位相差顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡により確認し、細胞機能を定量 PCR により評価した。

【結果と考察】
DS の異なる CNF-Br を用い、SI-ATRP によりグラフト密度の異なる PSSNa を CNF にグラフトした（準希薄ポリマーブラシ（SDPB）および CPB）。得られた CNF を培地に分散させ、HepG2 細胞と所定濃度で共培養したところ、CPB をグラフトした CNF のみが細胞とフロックを形成することが確認された。また、興味深いことに、CNF-CPB の濃度に依存してフロックサイズが制御できることや中空構造が形成されることが明らかとなった。さらに、CNF-CPB が CNF-SDPB や未修飾 CNF に比べて HepG2 細胞の機能を向上させることも遺伝子レベルにより確認している。この事実は CNF-CPB の足場材料としての有用性を示すものである。詳細については当日発表する。

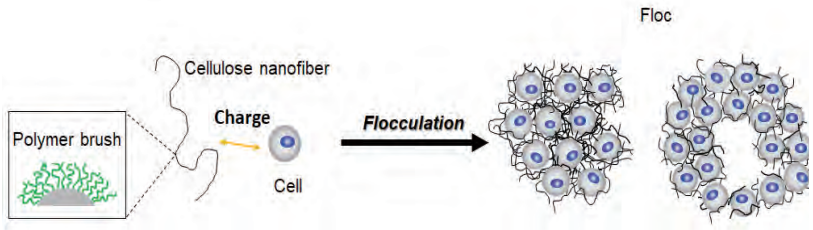


Figure 1. Flocculation of CNF-CPB with HepG2 cells.

参考文献
1. Lin, N.; Dufresne, A. *Eur. Poly. J.* **2014**, *59*, 302-325.
2 Yoshikawa, C.; Hoshiba, T.; Sakakibara, K.; Tsujii, Y. *ACS Applied. Nanomate.* **2018**, *1*, 1450-1455.

Flocculation of Cells by Cellulose Nanofibers Modified with Concentrated Polymer Brushes

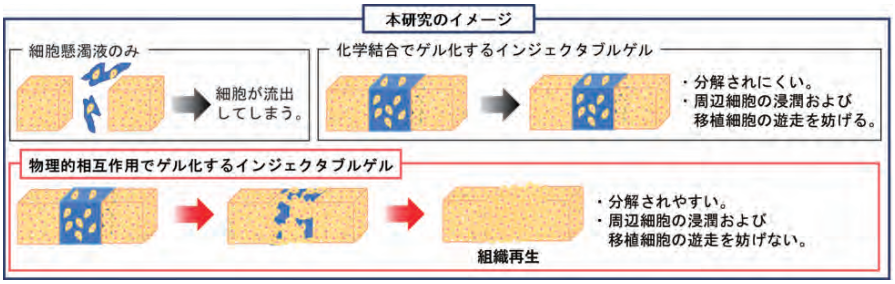
Chiaki Yoshikawa[1], Takashi Hoshiba[2], Keita Sakakibara[3], Tsujii Yoshinobu[3]
[1] International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science
[2] Frontier Center for Organic Materials, Yamagata University
[3] Institute for Chemical Research, Kyoto University
E-mail: yoshikawa.chiaki@nims.go.jp and sakaki@scl.kyoto-u.ac.jp

2P-107

可逆的相互作用を用いた細胞移植ハイドロゲルの作製

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
○穴水　美菜 ， 田畑　泰彦

【緒言】細胞移植治療は、組織の再生・修復を促す再生治療において魅力的なアプローチである。その中で、注射による細胞移植は外科的手術を必要としないため、患者への負担が少ない治療法として注目されている。しかしながら、細胞懸濁液のみの投与では、移植細胞が、目的の治療部位から流出してしまい、必要部位での細胞の治療効果は必ずしも高いものではない。そこで、移植細胞を目的部位に留める技術の研究開発が望まれている。その技術の一つとして、移植細胞とともに目的部位に注射後、速やかにゲル化し、移植細胞を目的部位に留めるインジェクタブルゲルがある。これまでの研究では、合成高分子を用い、ゲル化に化学結合を利用しているものが多く、生体内での分解が遅く、移植細胞がゲル内で増殖、移動できないという問題があった。本研究の目的は、生体適合性の高分子を可逆的な相互作用によってゲル化させることにより、生体内での分解が速く、移植細胞がゲル内で増殖、移動できる性質をもつインジェクタブルゲルを作製することである。本研究では、生体内での使用前例のあるゼラチンとアルギン酸を用いている。異なる割合で混合したゼラチン-アルギン酸のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)と種々の濃度の塩化鉄(3)/PBS 溶液を混合することにより、in situ でゲル化するシステムを考案した。作製したハイドロゲルの分解消失性、およびハイドロゲルに封入した細胞の生存・増殖性について調べた。また、細胞を封入したハイドロゲルを生体内に注射した後の細胞の挙動について検討した結果についても併せて報告する。



【実験と結果】アルギン酸(重量平均分子量(Mw)2,300,000、キミカ株式会社より供与)とゼラチン(Mw100,000,等電点 5.0、新田ゼラチン株式会社より供与)を異なる割合で含む PBS 溶液を種々の濃度の塩化鉄(3)/PBS 溶液を混合した。水溶液の流動性の変化を観察することにより、ハイドロゲル形成を評価した。アルギン酸、ゼラチン、および塩化鉄(3)の濃度の増加とともに、ハイドロゲルの形成が認められた。これは、用いた物質の濃度の増加にともない、架橋点が増加したためであると考えられる。作製したハイドロゲルを 1 ml の PBS 中に投入、37℃で数日間、振とうした。時間ごとに上清を採取し、溶出したアルギン酸およびゼラチンを定量することで、ハイドロゲルの分解消失を評価した。その結果、時間にともない、ハイドロゲルの消失が認められた。細胞をアルギン酸とゼラチン/PBS 混合液に懸濁させた。これを塩化鉄(3)/PBS 溶液と混合することで、細胞をハイドロゲル内に封入した。ハイドロゲルへの封入 1 および 3 日後に、生細胞数を計測することによって、ハイドロゲル封入後の細胞生存率を算出した。その結果、ゼラチンの濃度の増加とともに、3 日後における細胞生存率は増加した。また、ハイドロゲル封入 1 日および 3 日後の細胞数を比較したところ、ハイドロゲル内では有意に細胞が増殖していることを観察した。

Preparation of cell transplantation hydrogels based on reversible interaction

Mina Anamizu and Yasuhiko Tabata
Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawara-cho Shogoin, Sakyo-ku Kyoto 606-8507, Japan
Tel: +81-075-751-4868, Fax: +81-075-751-4646, E-mail: anamizu.mina.62s@st.kyoto-u.ac.jp

2P-108

破骨細胞・骨芽細胞活性を制御するリン酸化ナノセルロースからなる人工骨の開発

[1] 物質・材料研究機構　機能性材料研究拠点　バイオ機能分野
○西口　昭広[1]，田口　哲志[1]

【緒言】

人工骨は、超高齢社会に突入した我が国において、骨欠損に対する治療法として重要である。ハイドロキシアパタイトに代表される人工骨は、生体活性を有しているため、骨補填材として広く使用されている。より低侵襲な治療に向けて、インジェクション可能な人工骨の開発が行われているが、分解速度が速すぎるため、骨再生が完了する前に材料が吸収されるという課題があった。

本研究では、インジェクション可能であり、破骨細胞および骨芽細胞活性を制御することで分解速度が制御可能な人工骨を開発することを目的とする（Figure 1）。アレンドロン酸を導入したリン酸化ナノセルロース（pNC）とリン酸三カルシウムをコンポジット化した人工骨を作製し、破骨細胞および骨芽細胞機能に対する影響を評価した。

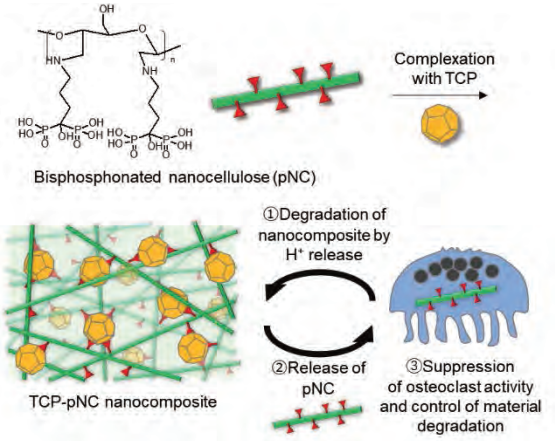


Figure 1. Schematic of pCNF nanocomposite and regulation of osteoclast activity.

【実験】

ろ紙粉末を過ヨウ素酸ナトリウムによって酸化することで、アルデヒド化セルロースを作製し、そこにアレンドロン酸（AL）を加え、2-ピコリンボラン存在下で、還元的アミノ化反応によってALを修飾したpNCを作製した。リン酸三カルシウム（TCP）とpNCを種々の濃度で混合することで、ナノコンポジット化し、アパタイト形成能および骨接着性を評価した。また、pNCが、マウスマクロファージ様細胞（RAW264.7）による破骨細胞形成に与える影響および、TCP-pNCに対するマウス骨芽細胞株（MC3T3-E1）の細胞接着性を評価した。

【結果と考察】

セルロースにALを導入することでpNCが作製可能であった（Figure 2a）。TCPとpNCを混合することで得られるTCP-pNCナノコンポジットは、インジェクション可能であり、疑似体液中でのアパタイト形成能および骨接着能を有していた。また、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色の結果より、pNCは破骨細胞形成を阻害することが示された（Figure 2b）。pHに応答してpNCを徐放する本材料は、破骨細胞の活性に応答して、破骨細胞形成を抑制すると期待される。さらに、TCP-pNCは骨芽細胞の細胞接着性を向上させた（Figure 2c）。以上の結果より、本材料は、破骨細胞・骨芽細胞機能が制御可能な新規な人工骨として有用であると考えられる。

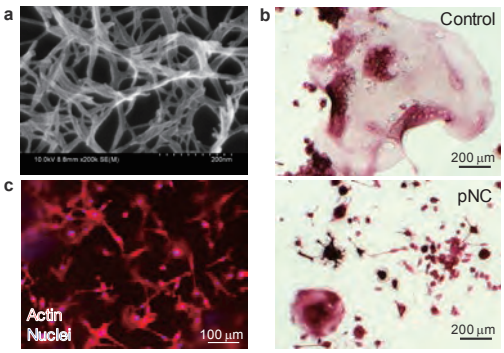


Figure 2. (a) SEM image of pNC. (b) TRAP staining of osteoclasts exposed to pNC. (c) Fluorescence microscopy image of MC3T3-E1 cultured on TCP-pNC nanocomposite.

An injectable artificial bone of bisphosphonated-nanocellulose that regulate osteoclast/osteoblast activity

Akihiro Nishiguchi[1], Tetsushi Taguchi[1]
[1]Biomaterials Field, Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science
Tel: +81-29-860-4987, E-mail: NISHIGUCHI.Akihiro@nims.go.jp

2P-109

SDS-PAGE を用いた材料表面上へのタンパク質吸着挙動解析

[1] 北見工業大学　医療材料研究室 , [2] 名古屋大学 材料表界面工学研究グループ
○川上　拓野 [1], 庄司　拓巳 [1], 黒田 健介 [2], 大津　直史 [1]

【緒言】
生体埋入後の材料表面における細胞接着の挙動は、生体内で材料表面に吸着しているタンパク質に依存し、タンパク質吸着は、生体内に存在するタンパク質の種類やその濃度、あるいは材料表面の化学的特性や形状などに支配される。材料表面の性質を制御することで、この吸着挙動を自由にコントロールできるようになれば、新しい生体材の料開発につながるであろう。ところで、これまである一種類のタンパク質の吸着挙動をそれぞれ個別に解析した研究はあったが、性質の違う複数のタンパク質が同時に材料に吸着する場合（競合的吸着）の挙動を解析した研究は見当たらない。我々の研究室では SDS-PAGE 活用して表面に吸着した複数のタンパク質を分離し、それぞれを定量分析するプロセスの開発に成功した[1)]。そこで本研究では様々な材料表面に複数タンパク質の競合的吸着を行い、SDS-PAGE 分析を用いてこの吸着タンパク質の分離・定量を行い、競合吸着挙動を解析することを試みた。

【実験】
試料として、チタン（Ti）基板をエメリー紙で＃1200 のまで研磨したもの（未処理 Ti;水接触角 91.5° ±9.0)、180℃の蒸留水中に 3 時間水熱処理することで表面を親水化したもの （水熱処理 Ti;水接触角 10.5° ±3.4)、コロナ放電で親水化処理したポリスチレン(PS)、以上の 3 つを用いた。これら試料を、アルブミン(BSA)、リゾチーム(LSZ)およびフィブリノーゲン(Fib)を、単体または同時に含む PBS 溶液中に浸漬させ、300rpm で振とうしながら 37℃で 60 分間保持することでタンパク質を吸着させた。その後試料を、１％ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液中で 10 分間超音波洗浄することで、吸着タンパク質を SDS 溶液中に完全に抽出した。その後 SDS-PAGE でこの抽出液に含まれるタンパク質の存在比を調べた。尚、浸漬させるタンパク溶液の濃度は、合計が 25mg/ml になるように調整した。

【結果と考察】
図 1 は、BSA および LSZ を単独で、あるいは同時に含む溶液中に試料を浸漬した後、その表面に吸着したタンパク量を SDS-PAGE で測定したものである。まず、未処理 Ti と水熱処理 Ti を比較すると、水熱処理 Ti の方が LSZ の吸着量が顕著に増加した。これは親水性を向上させたことでチタン表面がより負に帯電し、プラス電荷を持った LSZ を引き付けたためだと考えられる。また高分子の PS 表面上では、Ti と比較して、BSA および LSZ ともに吸着量が増加していた。これは PS の表面が Ti と同様に負に帯電しているためだと考えられる。また、BSA と LSZ を競合吸着させた場合、すべての試料表面において合計吸着量が増加していることが見て取れる。これは、それぞれのタンパク質が静電的反発等により互いの吸着を大きく阻害しないことを示唆する。以上より、タンパク質の吸着は、材料表面の帯電およびタンパク質の電荷状態に大きく左右される事が明らかとなった。

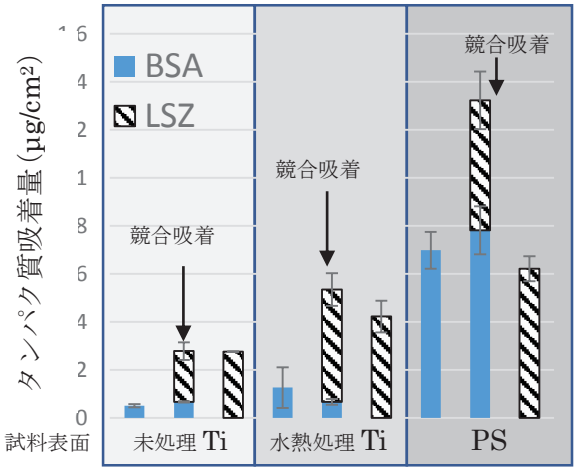


図 1 各試料表面上に吸着した BSA および LSZ の量

1)　2018 年 春季日本金属学会　吸着タンパク質分別定量のための表面タンパク質抽出方法の検討　川上 拓野,大津 直史

Analysis of protein binding behavior on the material surface using SDS-PAGE

Takuya Kawakami[1],Takumi Syoji[1],Kensuke Kuroda[2], Naohumi Ohtstu[1]
[1]Biotechnology and Environmental Chemistry Kitami Institute of Technology
[2]Nagoya University Material Table Interface Engineering Research Group
Tel: 0157-26-9561 , E-mail: m1852500026@std.kitami-it.ac.jp

2P-110

非一様弾性場・非定住培養による間葉系幹細胞の品質保持

[1]九州大学　先導物質化学研究所，[2]国立医薬品食品衛生研究所　再生・細胞医療製品部
○ 森山 幸祐[1]，久保木 タッサニーヤー[1]，澤田 留美[2]，辻 ゆきえ[1]，江端 宏之[1]，佐々木 沙織[1]，山本 安希[1]，田中 和沙[2]，河野 健[2]，木戸秋 悟[1]

【緒言】間葉系幹細胞(MSC)は多分化能や種々の有用なサイトカイン生産能を有することから、再生医療等製品における細胞源として注目される幹細胞である。しかし一方で、MSC の特性は細胞ロット間におけるばらつきが大きいことが問題として挙げられており、その品質を保証する標準的な培養系の構築が強く望まれている。MSC 品質変化の要因の一つとして細胞外環境の力学的因子の影響が挙げられる。近年、培養基材からの力学的刺激(メカノシグナル)の入力履歴の記憶に伴う不可逆的な分化偏向の誘導が、MSC の品質変化に起因していることが報告されており、メカノシグナル入力の精密制御を可能とする培養力学場の構築が課題となっている。

この問題に対し本研究では、弾性パターニングゲルを培養基材として利用した MSC 未分化保持培養系の構築を目指す。硬-軟領域を有する弾性場において MSC の非定住運動が実現すれば、各領域に対応した分化偏向が連続的に誘導されることで、メカノシグナル入力の履歴を消去できると考えられる。その結果、不可逆的な分化偏向が抑制され、未分化状態を保持した培養系が構築できると考えた。本発表では細胞運動に伴うメカノシグナル入力の動的制御を可能とするゲル基材の設計及びその基材上で培養した MSC の網羅的遺伝子解析の結果について報告する。

【実験】高分子材料としてスチレン基を側鎖に修飾した光硬化性ゼラチン(StG)を用い、光開始剤(sulfonyl camphorquinone)を含むゲル前駆溶液を調整後、60 mW/cm^2 の連続光を照射することで、ベースとなる低弾性率ゲルを作製した。PC 制御型パターン光照射装置を用い、ベースゲルにパターン光を追加照射することで弾性パターニングゲルを作製した。作製したパターニングゲル上に MSC を 1.5×10^3 cells/cm^2 となるように播種し、タイムラプス観察を 24 時間行った。細胞が基材上を非定住運動していることを確認するため、硬-軟領域における細胞の滞在時間を求めた。また、パターニングゲル上で 4 日間培養を行った後、RNA を単離し、mRNA 発現の網羅的解析を行った。

【結果と考察】異なる分化偏向を誘導する弾性率条件として軟領域を~2 kPa、硬領域を>20 kPa と設定した。しかしながら、このような弾性率非一様場において MSC は硬領域指向性運動(Durotaxis)を誘起する。つまり運動に伴うメカノシグナル入力の振動を実現するためには、Durotaxis による硬領域への定住を回避する必要がある。この問題に対して、硬-軟領域のパターン形状の最適化による非定住運動の実現を目指した。これまでに我々は、硬領域が軟領域に向かって凸の形状を有する弾性境界で、軟領域指向性運動(負の Durotaxis)が誘起されることを明らかにしている[1]。そこで、硬領域が三角形状のパターニングゲルを考案した[2]。三角形の辺では Durotaxis が、各頂点から負の Durotaxis が誘起されることで非定住運動が実現すると考えた。三角形の辺を 150 μm に設定したゲル上で MSC の培養を行い(Fig. 1, left)、硬-軟領域に滞在した時間を求めた結果、MSC は各領域を～4 時間周期で非定住運動していることを確認した(Fig. 1, right)。さらに網羅的遺伝子解析結果から、パターニングゲル上培養後の MSC は通常使用されるプラスチック皿や均一弾性ゲル上に比べ、運動及び増殖、分化に関連する遺伝子群の顕著な発現上昇が観察され、MSC の品質保持培養への可能性が示唆された。

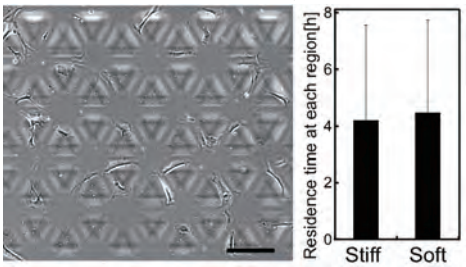


Figure 1. Left: Phase-contrast image of MSC on microelastically-patterned gels with triangular stiff regions. Scale bars: 200 μm. Right: Mean residence time at each region (*n*=20).

【参考文献】[1] Ueki. A., Kidoaki. S. *Biomaterials* **2015,** *41*, 45-52.　[2] 特願 2018-044437.

Quality assurance of mesenchymal stem cells via nomadic cultivation on heterogeneous elastic field

Kosuke Moriyama[1], Thasaneeya Kuboki[1], Rumi Sawada[2], Yukie Tsuji[1], Hiroyuki Ebata[1], Saori Sasaki[1], Aki Yamamoto[1], Kazusa Tanaka[2], Ken Kono[2], Satoru Kidoaki[1]
[1]Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University
[2]Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences
Tel: +81-92-802-2507, Fax: +81-92-802-2509, E-mail: kidoaki@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

2P-111

異種脱細胞骨格を用いた気管移植における脂肪幹細胞の有用性

長崎大学大学院医歯薬総合研究科 腫瘍外科学分野
○久永真，土谷智史，石井光寿，溝口聡，福田明子，小畑智裕，濱崎景子，松本桂太郎，永安武

【目的】異種移植はドナー臓器不足の解決方法として世界中で様々な研究がなされている。その際、異種抗原に対する急性拒絶反応が問題となるが、その対応として我々の施設では脱細胞骨格を用いた気管移植を行っているが、完全に異種抗原を除去することは困難で免疫抑制剤の使用が不可欠である。近年、間葉系幹細胞の免疫抑制作用が注目されており、特に脂肪幹細胞は他由来の幹細胞と比較して低侵襲で多量に採取可能である。今回我々は脱細胞化豚気管支骨格のラットへの移植に対する脂肪幹細胞を用いた免疫抑制効果の検討を行ったので報告する。
【対象及び方法】豚(LWD)脱細胞化気管支をそのままラット(Brown Norway)へ気管移植した。その際同モデルへ 1×10^6 の脂肪幹細胞を投与し(n=5)、各群の 7 日後の病理学的、血清学的検討を行った。A 群；脱細胞化なしの豚気管支、B 群；脱細胞化施行群、C 群；脱細胞化＋脂肪幹細胞投与群。
【結果】HE 染色においては C 群で移植気管内腔の狭窄や周囲炎症細胞の波及が他群に比べ少なく、免疫染色では CD4 陽性細胞は A 群では認めたが、B および C 群では認められなかった。CD８陽性細胞数は A および B 群に対し C 群では優位に少なかった。血清学的検査において C 群での各種炎症サイトカインの低下を認めた。
【考察】異種組織骨格では、脱細胞化に加え脂肪幹細胞投与で免疫反応はさらに抑制された。

Title: Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate rejection in a heterotopic decellularized tracheal transplantation model

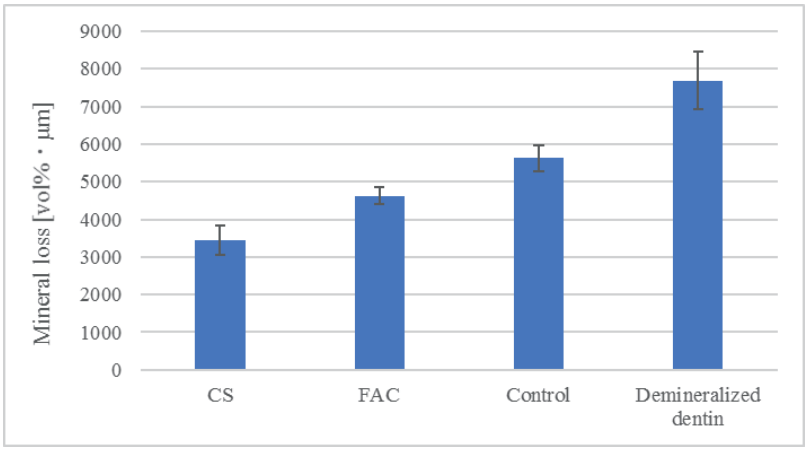
Makoto Hisanaga, Tomoshi Tsuchiya, Mitsutoshi Ishii, Satoshi Mizoguchi, Akiko Fykuda, Tomohiro Obata, Keiko Hamasaki, Keitaro Matsumoto and Takeshi Nagayasu1,6
Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8501, Japan
Tel: +81-95-819-7304 Fax: +81-95-819-7306 E-mail: hisanagamakoto@gmail.com

2P-112

ケアダイン シールドによる象牙質の再石灰化について

株式会社ジーシー
○吉満　亮介，熊谷　知弘

【緒言】
歯質根面はう蝕リスクが高いため，抗菌，脱灰抑制，再石灰化等の効果を有する材料が求められる。そこでジーシーでは新規機能性フィラーとして亜鉛，フッ素，カルシウムを含有するBioUnionフィラー，さらにBioUnionフィラーを配合するケアダイン シールドを開発した。本製品はBioUnionナノフィラー分散液とリン酸水溶液から成り，歯面に塗布することでBioUnionナノフィラー，リン酸亜鉛等のクリスタル粒子層を形成し，亜鉛，フッ化物，カルシウムイオンを溶出する。本研究ではケアダイン シールドによる根面象牙質の再石灰化について評価した。
【実験】
#1200 耐水研磨紙にて研磨した牛歯歯根象牙質に直径 3mm の穴をあけたテフロンシールを貼り試験面とした。脱灰液(50mM 酢酸，1.5mM $CaCl_2$，0.9mM KH_2PO_4，pH4.5)にて 37℃，60 時間脱灰後，試験面にケアダイン シールド(CS)，フルオロアルミノシリケートガラス塗布材(FAC)をそれぞれ塗布した(コントロール：塗布無)。その後，人工唾液 (20mM HEPES，30mM KCl，0.2mM $MgCl_2$，0.7mM $CaCl_2$，4mM KH_2PO_4，pH7.0)にて 37℃，4 週間浸漬した。試験面部を厚さ 1mm にスライスし，μCT を用い透過像を撮影し，画像解析にて解析した。
【結果と考察】
再石灰化試験の結果，CS および FAC のミネラルロスはコントロールよりも低い値を示した($p<0.05$)。さらにCSのミネラルロスはFACよりも低い値を示した($p<0.05$)。FACはフッ化物イオンを溶出するのに対し，CSはフッ化物イオンだけでなく亜鉛イオン，カルシウムイオンも溶出する。カルシウムイオン，フッ化物イオンは脱灰した歯質に取り込まれハイドロキシアパタイト，フルオロアパタイトとして結晶成長し，再石灰化を促進することは広く知られている。亜鉛イオンについてもカルシウム沈着を促進することや，Scholzite($CaZn_2(PO_4)_2 \cdot 2H_2O$)，Hopeite($Zn_3(PO_4)_2 \cdot 2H_2O$)などの結晶を形成することが報告されている。以上のことにより，亜鉛，フッ素，カルシウムイオンを溶出するケアダイン シールドは高い再石灰化効果を有していることが示唆された。



Effects of CAREDYNE SHIELD on remineralization of root dentin
Ryosuke Yoshimitsu, Tomohiro Kumagai
GC Corporation
Tel: +81-3-3965-1233, Fax: +81-3-3965-1655, E-mail: ryosuke_yoshimitsu@mb.gcdental.co.jp

2P-113

カラーコンタクトレンズの摩擦特性に関する予備的検討

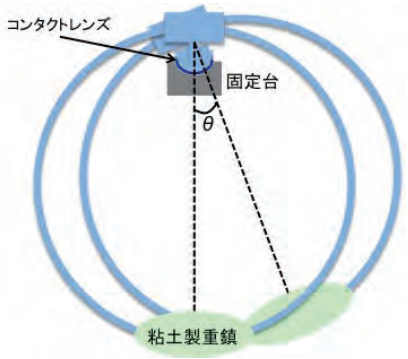
[1]国立医薬品食品衛生研究所　医療機器部，[2]東邦大学大学院医学系研究科 眼科学講座，
[3]北里大学 医療衛生学部 医療工学科 臨床工学専攻，[4]株式会社シード 研究開発部

○中岡 竜介[1]，岩下 紘子[1]，堀 裕一[2]，馬渕 清資[3]，酒井 利奈[3]，氏平 政伸[3]，松永 透[4]，
酏島 由二[1]

【緒言】平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金特別研究事業「カラーコンタクトレンズの規格適合性に関する調査研究」において、市販カラーコンタクトレンズ（CL）の色素局在性を TOF-SIMS を用いて解析した結果、一部のレンズで色素が表面に露出している事例が確認された。装用した CL は瞬きする毎に上まぶた又は角膜と摩擦し、その程度によっては物理的影響により上皮障害を起こしうることが知られている。カラーCL の使用に由来する眼障害発生の原因の一つとして、不適正使用が挙げられるが、実臨床ではレンズ自体の品質が疑われる症例も報告されている。カラーCL に含まれる色素と摩擦特性との相関性について検討した研究は少ないと共に、過去の報告ではレンズ全体の摩擦特性を評価できない実験系を用いているのが現状である。

そこで本研究では、カラーCL の摩擦特性とその使用に由来する眼障害発生の相関性を評価する一環として、色素局在部位が判明しているカラーCL の摩擦係数を振子式摩擦測定装置により解析し、色素局在部位がレンズの摩擦特性に与える影響を評価する予備的検討を行った。

【実験】今回使用した振子式摩擦測定装置の概略を右図に示した。シリコン製接着剤により試料となる CL を振子中の半球に接着し、生理食塩水を 0.4 mL 加えた PET 製臼蓋に設置した後、初期角度 30°で振子を振動させ、１振動毎の減衰角度を画像撮影装置の映像から読み取り、下式によりレンズの摩擦係数 f を算出した。



$$f = \frac{L \cdot \Delta\theta}{4r}$$

L：重心までの距離
$\Delta\theta$：１振動毎の減衰角度
r：レンズ摩擦面の半径

試料には、上述した特別研究で用いた市販カラーCL の中から色素局在部位の異なる製品を複数選択した。また、市販の透明 CL と Pigment Yellow139 をまぶた側に塗布したレンズ（PY-CL）を対照として使用した。

【結果と考察】振子式摩擦測定装置により算出された透明 CL の摩擦係数は 0.03 であった。一方、カラーCL の摩擦係数は 0.03-0.11 であり、透明 CL と比較していずれも高値を示した。PY-CL の摩擦係数は 0.13 であり、今回評価した試料中で最も高い値を示すことが判明した。また、色素局在部位がまぶた側のレンズの摩擦係数は、角膜側に色素が存在するレンズよりも高くなる傾向が認められた。これらの結果から、透明 CL と比較して、カラーCL は色素露出の有無を問わず、摩擦係数が増加すると共に、色素局在部位と摩擦係数には一定の相関性があることが示唆された。今回の予備的検討では、レンズの材質やベースカーブの違いによる影響を考慮していない。今後、それらの影響を個別に評価し、カラーCL の摩擦特性へ与える影響を検討すると共に、得られるデータの信頼性を向上させるため、生体環境を模した実験系を構築する予定である。最終的には、家兎眼装用試験も行い、摩擦特性と眼障害発生との因果関係の解明を目指す。

Preliminary study on frictional property of decorative contact lenses

Ryusuke Nakaoka[1], Hiroko Iwashita[2], Yuichi Hori[2], Kiyoshi Mabuchi[3], Rina Sakai[3], Masanubu Ujihira[3], Toru Matsunaga[4], Yuji Haishima[1]

[1]Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, [2]Department of Ophthalmology, School of Medicine, Toho University, [3]Clinical Engineering Course, Faculty of Medical Engineering and Technology, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, [4]Research and Development Department, SEED Co., Ltd.

Tel: +81-44-270-6600 ex.1721, Fax: +81-44-270-6545, E-mail: nakaoka@nihs.go.jp

2P-114

光誘起型架橋ポリマーによる高分子多孔体の表面機能化

東京大学大学院工学系研究科
○深澤　今日子，Sheng-Han Chen，石原　一彦

【緒言】高分子多孔体は、医療の分野において、血液から血球成分の分離または病因物質の除去など分離・精製を行う基材として利用されている。近年、様々な多孔化技術が開発され、ナノ～サブミリサイズまで微細構造を制御可能となっている。一方で、多孔体細孔内の表面機能化に関しては、効率的に処理する方法が確立されていないのが現状である。多孔体の表面機能化が簡便にできれば、より高精度でかつ選択的な分離・精製が可能になると期待できる。そこで我々は、多孔体の表面処理方法として、低分子の光活性剤と N-アルキル置換アニリン基の架橋反応を利用したポリマーシステムを考えた。この系では、光照射によって光活性剤から発生したラジカルが、ポリマー鎖側鎖の N-アルキル置換アニリン基に連続的に反応し最終的に架橋構造となる。すなわち、光照射により細孔内に吸着したポリマーが架橋され、安定なポリマー薄膜層を形成できると考えられる。本研究では、細孔内表面に親水性と防汚特性を付与することを目的とし、2-(N-ethylanilino)ethyl methacrylate (PMA) と 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) の共重合体(PMP) (図 1) を合成した。その際、ランダム型(PMrP)およびブロック型(PMbP)のポリマーを合成し、分子構造の違いが特性に及ぼす影響を考察した。表面処理後の親水性および防汚特性評価として、水の接触角およびタンパク質の吸着量を測定した。

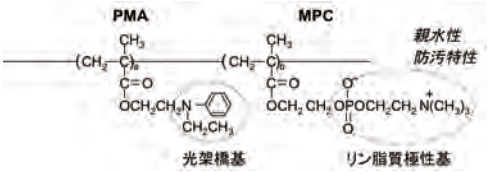


図 1. 光誘起型架橋 MPC ポリマー(PMP)の構造

【実験】光活性剤である tribromoethanol(0.25 wt%)と PMP (0.5 wt%)をエタノールに溶解し、コーティング溶液とした。孔径 20 μm のポリエチレン(PE)多孔体をコーティング溶液に浸漬し、乾燥後、光照射(254 nm)を 6 分間行った。エタノール溶液中で多孔体を洗浄し、未反応のポリマーを除去した後、各種分析(XPS, IR 測定)に用いた。また、蛍光分子を含む PMP を合成し、共焦点レーザー顕微鏡にて多孔体の断面を観察した。親水性評価として、多孔体表面での水接触角の時間依存測定を行った。また、防汚特性評価としてフィブリノーゲンの吸着量を MicroBCA 法により決定した。

【結果と考察】 表面処理後、XPS および IR 測定で MPC ユニットに由来するピークが検出され、PE 表面が PMP で覆われたことが確認された。また、PMP が溶解するエタノール中で超音波洗浄した後も同様にピークが検出され、PMP が安定に PE 表面に結合していることがわかった。共焦点レーザー顕微鏡では、PE 多孔体の内部にも強い蛍光が確認され、この表面処理方法で細孔内を処理できることが明らかとなった。また、親水性評価として、水接触角の時間依存性を測定した。未処理の PE 表面の水接触角は 120° 以上であり、この高い値は 16 秒間以上維持された。一方、PMrP および PMbP で処理した表面の水接触角はそれぞれ 90° および 58° であり、これらの値は時間と共に減少し、12 秒間以内に 0° となった。すなわち、疎水性の PE 多孔体は PMP の表面処理により親水性となり水を吸着する多孔体となった。また、PMbP で処理後、フィブリノーゲンの吸着量は未処理の PE 基材に比べ 95%以上減少した。MPC ポリマーは、タンパク質の吸着を抑制することが知られており、その特性が表面処理により PE 多孔体に付与できた。本研究の表面処理方法は、高分子多孔体に任意の機能を付与することが可能であり、新しい分離・精製基材として代謝系医療デバイスなどへの応用が期待できる。

本研究は AMED S-イノベーション「革新的医療を実現するためのバイオ機能材料の創製」によった。

Surface Functionalization of Porous Biomaterials with Photoinduced-closslinking Polymer System

Kyoko Fukazawa, Shen-Han Chen, Kazuhiko Ishihara
Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo
Tel: +81-3-5841-7124, Fax: +81-3-5841-8647, E-mail: fukazawa@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

2P-115

Large-scale preparation of hair follicle germs for hair regenerative medicine

Tatsuto Kageyama[1,2], Junji Fukuda[1,2]*
[1] Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology,
2 Faculty of Engineering, Yokohama National University, kageyama-tatsuto-tp@ynu.jp

Regenerative medicine has been increasingly expected as a new approach for the treatment of hair loss. Recent studies have shown that transplantation of a compartmentalized hair follicle germ (HFG), which was fabricated by integrating two respective aggregates of mesenchymal and epithelial cells, led regeneration of hair follicles. This approach is excellent, but one drawback is to require labor steps for the preparation of the germs particularly considering that hundreds of thousands of hair follicles are necessary for a single patient. In this study, we propose a robust approach for a large-scale preparation of HFGs through self-organization of cells. We revealed that when the two types of hair cells, mouse epidermal and mouse/human mesenchymal cells, were mixed in suspension and seeded in a microwell they initially formed a randomly-distributed single cell aggregate but then spatially separated each other and exhibited typical morphological features of HFG in three days of culture. This finding facilitated a large-scale preparation of compartmentalized HFGs (~5,000 HFGs). We fabricated a microwell array culture device with oxygen-permeable silicone (PDMS) and demonstrated that oxygen supply through the bottom of the silicone device was crucial for the spontaneous formation of HFGs (Fig.1A-C). The HFGs efficiently generated hair follicles and hair shafts after intracutaneously transplanted in the back of nude mice (Fig.1D). The regenerated hair follicles also showed the hair cycle through the rearrangement of follicular stem cells. Our preliminary results showed that spontaneous cell separation and HFG formation could be achieved by seeding human keratinocytes and human dermal papilla cells on the chip. This simple HFG preparation approach may provide a promising strategy for advancing hair regenerative medicine.

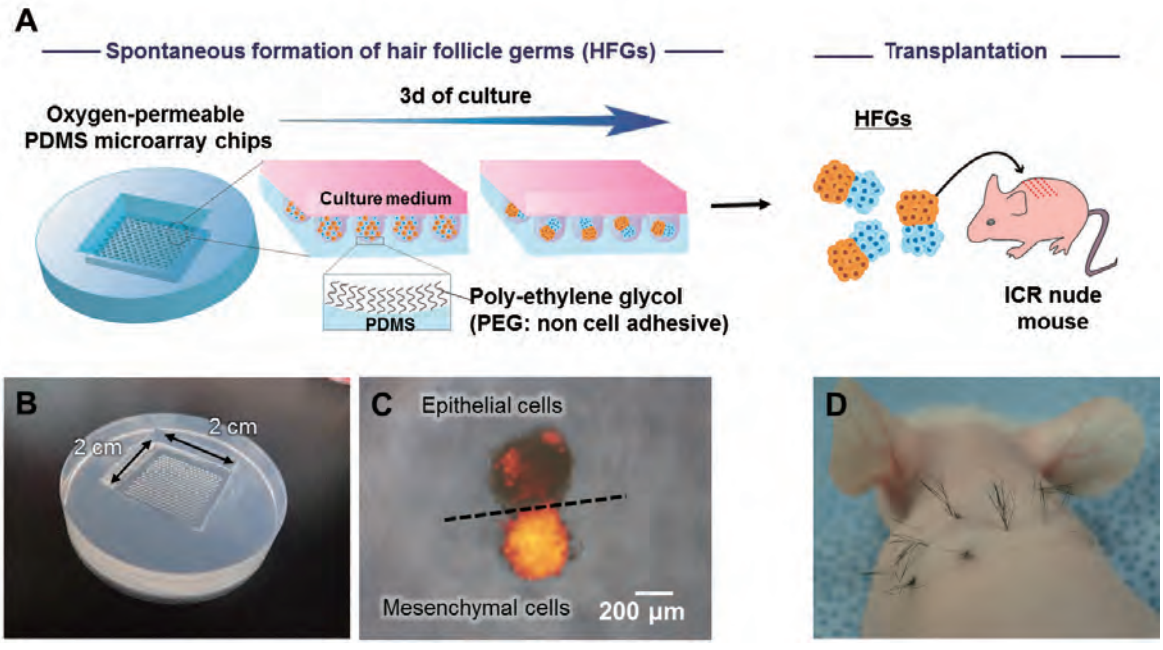


Fig. 1 Large-scale preparation of HFGs. (A) Schematics for spontaneous formation of HFGs and their intracutaneously transplantation. (B) Fabricated oxygen-permeable PDMS microarray chips. (C) Spontaneously formed HFGs at 3 d after seeding. (D) Hair shafts generated from transplanted HFGs.

2P-116

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL NANOPARTICLES FOR THE DETECTION OF BACTERIA

Yuji Tsuchido [1,2], Aya Kitamura[1], Yuna Kasai[1], Hiroyuki Kobayashi[1], Takeshi Hashimoto[1], and Takashi Hayashita[1*]

[1]Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University, ta-hayas@sophia.ac.jp
[2]Current address: Bioengineering Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN,

Nowadays, there are a lot of patients in hospital with weakened immune systems. Thus, to prevent in-hospital infection caused by pathogenic bacteria is one of the important problems. Also, food poisoning caused by bacteria could threaten the human health, so it is an important problem to provide safety food and water. For the detection of bacteria, 'culture method' is well known as standard conventional method. However, culture method spends a lot of time to detect bacteria, so it might spread infectious diseases. To overcome this disadvantage, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) analyses have been developed in recent years. These methods could achieve comparatively rapid detection of bacteria, but these methods are high cost, require clean room, and require advanced technical knowledge to use.[1)] Therefore, many researchers has attracted to develop more rapid and simple method of bacteria detection. In particular, nanoparticle sensors are promising because their surfaces and chemical structures are easily controlled and various types of recognition sites can be introduced on the nanoparticle surface. In addition, the nanoparticles are inexpensive, have low toxicity, and can be easily handed.

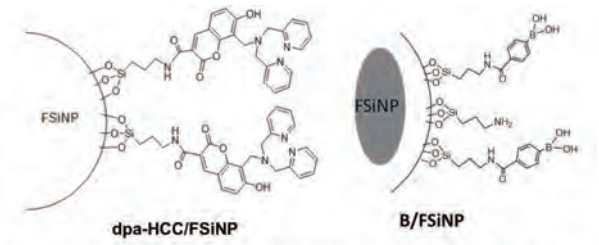


Fig. 1. Schematic representation of dpa-HCC/FSiNP and B/FSiNP complex.

Herein, we developed dipicolylamine or boronic acid-modified fluorescent silica nanoparticle (dpa-HCC/FSiNP or B/FSiNP) complex for bacteria detection based on the recognition of phosphate group or saccharide chain on the bacteria surface (Fig. 1). Also, we investigated the interaction between pathogenic bacteria and dpa-HCC/FSiNP or B/FSiNP complex.[2)]

First, dpa-HCC was synthesized by Mannich reaction of dipicolylamine, formamide and 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid. Fluorescent silica nanoparticle contained [$Ru(bpy)_3$] (FSiNP) was synthesized as reported.[3)] Then, dpa-HCC or 4-carboxyphenylboronic acid was modified to the surface of FSiNP and obtained dpa-HCC/FSiNP or B/FSiNP complex. We evaluated the recognition function of Cu-dpa-HCC/FSiNP complex for phosphoric acid derivatives (monophosphate, pyrophosphate, triphosphate, ATP) by fluorescent spectroscopy and revealed that strong response for tri phosphoric acid. Also, the response for pathogenic bacteria (*E. coli* and *S. aureus*) was observed by fluorescent microscopy. Both dpa-HCC/FSiNP and B/FSiNP complex and bacteria formed visible aggregates within 10 min. These results indicate that Cu-dpa-HCC/FSiNP and B/FSiNP complex could detect phosphate group or saccharide chain of bacterial surface. In conclusion, we could detect bacteria by forming large aggregation.

1) C.-Y. Wen, J. Hu, Z.-L. Zhang, Z.-Q. Tian, G.-P. Ou, Y.-L. Liao, Y. Li, M. Xie, Z.-Y. Sun, and D.-W. Pang, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 1223-1230.
2) Y. Kasai, H. Kobayashi, Y. Tsuchido, T. Hashimoto, N. Kanzawa, T. Hayashita, *Chem. Lett.*, **2016**, 45, 749-751.
3) X. J. Zhao, L. R. Hilliard, S. J. Mechery, Y. Wang, R. P. Bagwe, S. Jin, W. H. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, 101, 15027-15032.

2P-117

Fabrication of Intracellular ATP-responsive Polyion Complex Micelles for Smart Nucleotide Therapeutics Delivery

Mitsuru Naito[1], Naoto Yoshinaga[2], Takehiko Ishii[2], Akira Matsumoto[3], Yuji Miyahara[3], Kanjiro Miyata[2], Kazunori Kataoka[4,5,*]
[1]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, [2]Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, [3]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, [4]Policy Alternatives Research Institute, The University of Tokyo, [5]Innovation Center of NanoMedicine, Kawasaki Institute of Industrial Promotion, kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

Small interfering RNA (siRNA) offers striking therapeutic potential as a molecular-targeted drug, because of its unique ability to down-regulate target mRNA expression. However, siRNA-based therapies have severely limitation to clinical applications, mainly due to its poor bioavailability stemming from susceptibility to enzymatic decomposition and renal filtration as well as inefficient cellular internalization. To overcome these bottlenecks, a great deal of efforts has been focused on fabrication of smart polymeric nanocarriers suitable for delivery of siRNA. Encapsulating siRNA into such nanocarriers has proven to be a feasible approach to improve both the longevity of siRNA in blood stream and the cellular internalization of siRNA with enhanced bioavailability. Nevertheless, there is still much room for improvement in the polymer design to better address a conflicting challenge inherent to this kind of approaches, that is, stable encapsulation of siRNA in the extracellular milieu followed by the prompt release when arriving specifically at cytoplasm of the target cells. One promising approach is a fabrication of polyion complex (PIC) micelles with intracellular-responsive functions, such as disulfide bondings (***Biomaterials*** 2014, 35, 7887). However, thiol moieties are sensitive to oxidation and occasionally cause difficulty in the handling and restriction of nanocarrier design. An alternative molecular design for stimuli-responsive siRNA delivery systems is required.

We fabricated a simple but effective molecular design for an intracellular-responsive smart siRNA delivery system (***Angew. Chem. Int. Ed.*** 2012, 51, 10751). The PIC micelles utilize a phenylboronate functionality, which can form reversible ester formation with 1,2-*cis*-diols on the ribose ring at the end of siRNA and thus, PIC micelles turned to be stable at the extracellular condition. Notably, the boronate ester can be exchanged by other competing biomolecules containing 1,2-*cis*-diols, thus providing a molecular basis for 1,2-*cis*-diol-responsive siRNA release. Indeed, we demonstrated adenosine triphosphate (ATP), which also contains 1,2-*cis*-diol moiety, triggered the concentration-dependent release of siRNA encapsulated in the PIC micelles prepared from poly(ethylene glycol)-*block*-poly(L-lysine) (PEG-PLys) bearing 4-carboxy-3-fluorophenylboronic acid (FPBA) moieties in PLys side chains.

Although FPBA-modified PIC micelles (FPBA micelles) opened a new avenue for smart intracellular delivery of siRNA, a comparative study on the polymer structure-function relationship is yet to be elucidated in detail. It is reasonably assumed that the FPBA modification rate must be carefully controlled to balance the stability and the ATP-responsivity of the micelles. Thus, we have further developed the FPBA micelles to improve the gene-silencing capability and the stability of the micelles (***Macromol. Biosci***. 2018, 1, 1700357). We eventually demonstrated the FPBA modification rate in PEG-PLys critically affects its ATP-responsivity and structural durability. The FPBA modification rates of 20–35% were identified with the best performance in both the stability in serum-containing media at the extracellular concentration of ATP and the destabilization for the siRNA release at the intracellular level of ATP, leading to the significant RNAi activity. Recently, we have successfully developed the phenylboronate-based ATP-responsive PIC micelles for gene and messenger RNA delivery systems (***J. Am. Chem. Soc.*** 2018, 139, 18567).

This is the first study to demonstrate the intracellular-ATP-responsiveness with synthetic polymers. Because of its quite simple chemistry; just conjugating phenylboronic acid moieties into polymers, this strategy can be easily diverted into other biomaterial applications. Indeed, we have already demonstrated the effective siRNA, DNA and mRNA delivery with this strategy. We strongly believe that the phenylboronic acid-based ATP-responsive system provide a completely new directions in biomaterial fields.

発表者索引

(Index to Authors)

あ

相澤守 39, 41, 47, 48, 49, 58, 59, 214, 224, 262, 265, 279, 376, 387
青木和広 25, 124
青木隆史 66, 464
青木元秀 53, 321
青柳敦士 48, 271
青柳健太 31, 165
青柳 隆夫 45, 248
青山丈 62, 418
青山星海 62, 423
青山祐介 67, 477
赤木隆美 54, 64, 329, 438
赤坂 浩亮 28, 146
明石満 54, 64, 329, 438
明石祐典 62, 413
秋田和也 49, 276
秋元文 18, 56, 93, 352
秋山雄大 51, 301
秋山義勝 22, 113
秋山好嗣 27, 65, 139, 452
秋吉一成 18, 28, 33, 37, 48, 91, 149, 178, 199, 273
谷口彰良 53, 325
浅井治夫 31, 167
浅沼 浩之 37, 204
浅原 時泰 56, 351
朝山章一郎 29, 152
蘆田茉希 25, 47, 48, 66, 123, 261, 266, 459
網代広治 46, 55, 250, 345
我妻昭彦 31, 41, 168, 217
東倫之 37, 45, 195, 241
東慶直 55, 66, 345, 347, 468
麻生　隆彬 24, 37, 55, 56, 60, 66, 121, 202, 349, 351, 395, 462
安達 昌城 23, 116
安富諒 50, 284
穴田　貴久 25, 41, 59, 63, 130, 218, 381, 424
穴水美菜 67, 479
阿部航大 39, 214
阿部二郎 33, 180
阿部俊明 53, 324
阿部雅大 67, 476
天野日出 33, 179
綾野絵理 61, 402
荒木 裕子 23, 116
荒津史裕 43, 236
有坂慶紀 37, 52, 59, 66, 194, 315, 384, 463
有馬祐介 37, 200
アルハサンヘンドゥ 24, 118
安藤渉 48, 268
安楽　真樹 47, 257
安楽 泰孝 28, 150

い

伊井正明 33, 58, 182, 372
庵原啓司 59, 387
五十嵐　薫 48, 270
五十嵐 一紀 28, 146
李 圭培 63, 427
池内　尚 37, 204
池上遼 46, 251
池田裕介 61, 406
池戸　佑依 24, 121
生駒俊之 47, 54, 263, 334
伊澤惠子 64, 439
石井 武彦 69, 489
石井光寿 68, 483
石井善雄 41, 217
石川邦夫 32, 41, 49, 59, 173, 221, 276, 383
石川聖人 43, 237
石崎千尋 24, 58, 117, 377
石原一彦 43, 47, 49, 57, 58, 66, 67, 68, 237, 259, 275, 370, 378, 469, 477, 486
石原正統 22, 105
石原　量 24, 49, 54, 60, 65, 121, 282, 336, 337, 395, 452
石丸佳樹 55, 66, 345, 468
石本卓也 16, 23, 73, 115
井関祥子 52, 315
伊勢裕彦 53, 64, 327, 446
磯部　潤 37, 200
磯山隆 47, 257
李誠鎬 41, 219
位高　啓史 25, 33, 126, 177
井田雄太 35, 193
一瀬博文 56, 353
市丸　裕晃 56, 354
井手純一 31, 164
井出千束 57, 367
井樋栄二 41, 218
伊藤　敦夫 41, 52, 222, 314
伊藤香 61, 404
伊藤耕三 46, 253
伊藤竣 53, 324
伊藤大知 53, 64, 66, 322, 436, 465
伊藤哲平 20, 99
伊藤 弓弦 23, 116
伊東莉菜 41, 224
稲永大夢 18, 93
井上　千種 65, 453
井上文仁 29, 151
井上　泰彰 28, 147
井上祐貴 47, 49, 57, 58, 66, 67, 259, 275, 370, 378, 469, 477
猪股祥子 65, 452
猪股泰将 66, 459
井原健介 47, 258
今里　聡 20, 103
今任景一 37, 43, 63, 196, 230, 426
今西悠華 48, 271
入江新司 52, 310
岩井敦史 31, 167
岩井聡一 54, 329
岩﨑清隆 30, 47, 67, 159, 259, 477
岩崎倫政 24, 31, 118, 119, 165, 166
岩﨑泰彦 20, 43, 44, 101, 235, 238
岩下紘子 68, 485
岩田隆正 67, 471
岩津実里 26, 132
岩波佳緒里 25, 128
岩松正 20, 100
岩丸祥史 51, 297

う

呉威廷 56, 351
上園将慶 25, 128
上田綾乃 47, 262
上田恭介 26, 131
上田智也 62, 416
上田浩司 64, 440
上田衛 58, 380
上田真結 58, 376
上沼駿太郎 46, 253
上野高義 30, 160
上野良之 27, 136
上原広貴 50, 289
上向井徹 55, 58, 347, 380
植村壽公 20, 22, 100, 107
上村葉 20, 22, 100, 107
魚住葵 28, 144
氏平政伸 68, 485
薄葉亮 19, 96
打越哲郎 25, 128
内田智士 33, 177
内田達也 53, 321
打田裕明 33, 182
内山詩乃 50, 292
宇都　甲一郎 18, 88, 94
梅澤雅和 55, 343
梅田晃治 66, 468
梅津光生 30, 159
梅林信弘 41, 222
梅村知也 53, 321
梅山諒也 49, 281
宇山恵美 67, 473
宇山浩 37, 55, 56, 66, 202, 349, 351, 462
浦岡俊夫 18, 89
上泉千草 31, 164

え

江川　聡 20, 98
江草宏 23, 115
江角将之 41, 217
枝常吾郎 18, 93
江端 宏之 68, 482
荏原　充宏 18, 24, 39, 45, 61, 88, 94, 122, 211, 248, 408
エミリオ　サトシ　ハラ 63, 432
袁喜達 52, 309
遠藤　達郎 65, 453

お

及川富美子 63, 435
尾池和樹 26, 133
王　鋭 48, 55, 270, 346
大愛景子 58, 378
大石達也 25, 123
大石雅子 56, 358

大石　由美子 19, 95
大石佳史 28, 145
大内創介 24, 122
大江剛 49, 276
大川 淳 20, 98
大川将志 53, 322
大木悠一朗 64, 436
大久保　力廣 25, 125
大坂直也 39, 58, 214, 376
大下真璃 55, 347
大角幸治 67, 474
太田歩 52, 317
大高　晋之 20, 43, 44, 101, 235, 238
太田誠一 53, 64, 66, 322, 436, 465
太田裕治 56, 352
大槻周平 62, 418
大槻　主税 39, 213
大槻直美 57, 369
大槻文吾 39, 212
大槻文悟 24, 58, 117, 379
大津直史 66, 467
大津陽平 24, 120
大友康平 27, 138
大永　崇 65, 454
大野　司 18, 88
大野優太 65, 456
大橋　萌 19, 95
大庭　伸介 64, 436
大原　智 25, 126
大場倭利 65, 458
大平涼太 20, 102
大谷亨 28, 50, 60, 61, 62, 143, 284, 391, 410, 417
大矢根綾子 23, 25, 116, 129
大藪淑美 57, 365
大矢裕一 28, 33, 49, 51, 60, 63, 66, 148, 182, 280, 281, 305, 399, 434, 461
大脇充裕 66, 467
岡崎　定司 48, 59, 272, 382, 385
岡崎正之 56, 358
緒方藍歌 18, 88
岡田直也 19, 97
岡田正弘 22, 48, 59, 63, 111, 267, 389, 432
岡野　光夫 17, 18, 51, 64, 83, 92, 306, 445
岡松　順子 67, 474
岡村愛 31, 41, 168, 217
岡村陽介 27, 65, 138, 448
岡本吉弘 56, 359
小川久美子 26, 134
小川智之 45, 246
小川雅人 61, 411
沖川侑揮 22, 105
沖田一歩 51, 300
興戸正純 56, 66, 355, 467
荻野秀一 64, 442
奥津弥一郎 24, 39, 117, 212
奥野修大 62, 418
尾坂　明義 59, 389
尾崎亮太 54, 332
長田健介 33, 177
尾澤昌悟 48, 271
小澤直樹 48, 266
小田淳志 64, 438
小田和音 50, 284
落合拓郎 56, 60, 360, 397
小野　勝彦 56, 354
小野公佳 37, 203
小野寺　智洋 31, 166
小野　博信 49, 274
小畑智裕 68, 483
尾前薫 40, 57, 216, 367

か

甲斐壮馬 31, 167
加々見早苗 49, 279
柿沼千早 31, 168
柿木佐知朗 52, 58, 62, 307, 372, 418
覚道奈津子 17, 82
梯　広大 26, 133
欠端雅之 41, 52, 222, 314
景山達人 64, 437
景山 達斗 69, 487
河西健吾 46, 253
笠井均 62, 414
笠井　祐那 69, 488
笠貫　宏 30, 159
梶井文彦 31, 167
鍛冶孝祐 60, 399
梶弘和 53, 324
加嶋祐佳 25, 123
柏崎亜樹 43, 236
春日敏宏 35, 39, 41, 58, 189, 214, 219, 376
片岡一則 28, 33, 69, 150, 177, 489
片桐明日香 54, 336, 337
堅田千裕 20, 103
片山佳樹 62, 415
加藤　功一 54, 57, 330, 368
加藤暢宏 40, 57, 216, 367
加藤雅俊 37, 202
加藤 竜司 18, 88
加藤玲子 57, 67, 366, 477
門田純平 62, 422
金井理 31, 165
金岡　宏明 39, 213
金澤秀子 18, 52, 60, 61, 63, 93, 317, 400, 402, 429
蟹江　慧 18, 88
兼清健志 57, 367
金子恒太郎 57, 363
金子真大 43, 237
金高　弘恭 55, 346
金髙弘恭 26, 48, 132, 270
兼平裕也 20, 99
鎌倉慎治 31, 49, 167, 277
上岡寛 63, 432
上村真生 55, 343
神谷典穂 51, 52, 60, 302, 316, 398
亀田恒徳 57, 369
萱島浩輝 23, 115
茅野英成 60, 395
河合 功治 55, 344
川井　忠 31, 167
河井利之 24, 39, 58, 117, 212, 379
川上　茂 50, 51, 55, 292, 303, 342
川上拓野 67, 481
河上強志 56, 359
川上 隼人 55, 344
川上浩良 29, 152
川上良介 27, 138
川岸弘毅 66, 461
川木晴美 26, 133
川﨑　大輝 65, 453
河崎　陸 28, 48, 51, 149, 273, 298
川下将一 26, 44, 45, 132, 240, 246
川添 直輝 43, 53, 63, 229, 323, 427, 428
川田交俊 39, 212
川西隆仁 53, 63, 321, 433
川原　公介 41, 226
河村　暁文 28, 52, 54, 60, 64, 144, 147, 308, 332, 396, 447
川村勇樹 52, 318
神澤信行 64, 439
甘中健登 65, 457
甘寧 61, 410
神戸裕介 33, 39, 43, 50, 183, 207, 231, 291

き

菊田明美 31, 172
菊池明彦 16, 18, 24, 27, 39, 49, 51, 54, 60, 65, 79, 92, 121, 122, 139, 211, 282, 306, 336, 337, 395, 452
木口 健太朗 28, 146
菊池正紀 25, 128
岸田晶夫 17, 20, 34, 39, 43, 58, 62, 84, 102, 184, 206, 233, 373, 422
岸田良 59, 383
岸村 顕広 28, 62, 150, 415
木造理萌子 49, 279
北岡卓也 56, 353
北垣壽 39, 212
喜種椋一 65, 452
北原　吉朗 67, 474
喜多村　文 69, 488
北山雄己哉 28, 45, 55, 61, 146, 244, 339, 409
橘田 久美子 47, 259
木戸秋 悟 68, 482
城所泰孝 41, 223
木下直哉 48, 273
岐部俊郎 25, 127
木南啓司 48, 265
金雅覽 51, 304
金　佑泳 31, 166
キム ヒョンジン 28, 150
キム ボブス 28, 150
木村和徳 27, 139
木村－須田廣美 20, 99
木村剛 20, 39, 58, 62, 102, 206, 373, 422
木村友香 22, 104
木本　克彦 25, 125
桐野泉 33, 179
切畑光統 51, 298
金　美花 22, 107

く

久代京一郎 37, 47, 195, 257
楠本健司 17, 82
楠本　哲治 59, 382
葛谷明紀 28, 33, 49, 51, 60, 63, 66, 148, 182, 280, 281, 305, 399, 434, 461
葛谷昌之 46, 251
國井沙織 40, 57, 216, 367
国富陽介 63, 432
久保木 タッサニーヤー 68, 482
久保田萌 53, 63, 321, 433
久保博嵩 18, 91
熊谷知弘 68, 484
熊谷直紀 67, 477
熊田英峰 53, 321
久米健一 25, 127
栗本理央 39, 211
黒子弘道 57, 369
黒田健介 56, 66, 355, 467
黒田直敬 50, 292
黒田良祐 40, 216
黒部裕嗣 16, 78

け

阮　立群 41, 225

こ

小泉大輔 59, 387
河野 健 68, 482
高蓓媛 59, 386
小枝清花 50, 294
小粥康充 55, 58, 347, 380
古賀 健司 25, 129
古閑崇 25, 127
小甲晃史 31, 165
古賀陽子 27, 136
小口亮平 57, 361
古島健太郎 33, 39, 181, 208
児島千恵 38, 205
小島規永 48, 271
小島秀仁 51, 296
小関良卓 62, 414
兒玉幸修 55, 342
小畠英理 53, 61, 320, 406
小林千人 57, 365
小林純 64, 445
小林慎吾 43, 47, 50, 67, 236, 259, 289, 477
小林尚裕 66, 466
小林　広幸 69, 488
小林真子 58, 373
小林諒太 46, 253
駒井しおり 48, 264
小正　聡 48, 59, 272, 382, 385
小正　裕 59, 382
小松周平 24, 49, 121, 282
小室博明 47, 56, 258, 356
小森谷薫 57, 67, 366, 477
古屋敷賢人 50, 291
小山潤 49, 275
近藤伸一 46, 251
近藤真由香 39, 58, 206, 373
合田達郎 27, 65, 135, 455
呉　江 32, 174
後藤健 49, 282
後藤公志 24, 39, 58, 117, 212, 379
後藤雅宏 51, 52, 60, 302, 316, 398
後藤洋子 53, 327

さ

齋藤 充弘 45, 248
齋藤祐幹 66, 460
齋藤寛 56, 358
齊藤雄太 58, 374
蔡孟諭 43, 236
酒井進 25, 130
酒井　康行 64, 446
酒井利奈 68, 485
榊原圭太 23, 57, 67, 114, 362, 478
坂口勝久 22, 113
阪口壽一 39, 210
坂巻 育子 25, 129
坂本　道治 64, 442
坂元　悠紀 64, 442
坂本裕紀 56, 67, 357, 471, 472
坂本渉 51, 299
櫻井良憲 51, 298
酒元竜 60, 391
笹井泰志 46, 251
佐々木　啓一 31, 63, 171, 424
佐々木 沙織 68, 482
佐々木淳一 20, 103
佐々木大輔 33, 180
佐々木寧音 64, 439
佐々木均 55, 342
佐々木誠 34, 185
佐々木瑞樹 43, 234
佐々木善浩 18, 28, 33, 37, 48, 91, 149, 178, 199, 273
佐々木 良平 28, 146
笹野哲郎 47, 56, 258, 356
笹山智史 63, 425
佐藤拓未 61, 403
佐藤智哉 63, 424
佐藤まりの 41, 221
佐藤悠人 50, 286
佐藤力哉 67, 476
佐藤諒弥 67, 472
佐野紘平 65, 457
佐野奈緒子 57, 369
鮫島 啓 47, 67, 259, 477
澤田和紀 65, 457
澤田晋一 18, 28, 33, 37, 91, 149, 178, 199
澤田俊樹 52, 312
沢田　博司 41, 226
澤田 留美 68, 482
澤　智裕 56, 354
三田　北斗 24, 66, 121, 463
財前絹子 47, 259

し

敷波保夫 58, 379
蔀 佳奈子 25, 49, 129, 274
篠原 満利恵 64, 446
嶋香織 25, 127
島川楓 48, 265
嶋田直彦 37, 56, 60, 204, 360, 397
島袋将弥 47, 261
清水孝彬 24, 39, 58, 117, 212, 379
清水　達也 17, 22, 63, 83, 113, 435
清水智弘 20, 99
清水優 24, 39, 117, 212
清水善久 51, 297
志村昌紀 63, 429
下田亮太 22, 105
肖　凌浩 31, 171
徐 薇 39, 209
秀野智大 62, 415
白川美徳 43, 234
志楽英之 64, 444
白土治己 30, 163
塩飽　由香利 25, 31, 41, 63, 130, 171, 218, 424
周芳伃 47, 257
聶文希 52, 307
城潤一郎 60, 62, 394, 413
徐　亮 31, 166

す

末信一朗 56, 60, 350, 392
末松良隆 17, 81
末吉　健志 65, 453
菅忠明 50, 292
菅沼杏子 67, 476
菅野伸彦 48, 268
菅谷　勉 49, 274
菅原章秀 55, 349
菅原なつみ 67, 476
杉浦幸作 49, 283
杉浦　悠紀 32, 173
杉野竜成 50, 62, 287, 415
杉本清二 57, 365
杉本駿介 43, 235
杉本光 33, 176
杉森文亮 20, 100
杉山航平 46, 251
鈴木　治 25, 31, 41, 53, 59, 63, 130, 171, 218, 326, 381, 424
鈴木香苗 26, 132
鈴木銀河 25, 125
鈴木敦也 54, 334
須藤英毅 31, 165
砂　真一郎 35, 187
砂山博文 45, 55, 244, 339
須磨 知也 28, 150
住田啓迪 51, 305

せ

瀬上裕斗 62, 416
関愛梨 54, 331

関田将伍 43, 236
関野　徹 59, 385
芹澤　武 52, 312

そ

曽昱豪 59, 385
早乙女　進一 20, 98
曽我公平 55, 343
園瀧誠一 50, 290
園田敏貴 35, 191
蘇亜拉図 58, 374

た

高井茂臣 41, 42, 58, 220, 223, 227, 377
髙市敦士 25, 123
髙井宏樹 33, 182
高井まどか 37, 45, 47, 195, 241, 257
高尾誠二 59, 382
高尾正樹 48, 268
高島　和希 41, 225
高嶋和磨 48, 268
高島義徳 55, 349
高玉　博朗 31, 169
高野恵里 45, 55, 244, 339
高橋功 33, 179
高橋泰伽 27, 138
髙橋大介 24, 118, 119
高橋勉 61, 412
髙橋　哲 31, 167
高橋宏信 17, 63, 83, 435
高畑雅彦 20, 99
宝田徹 27, 139
田川陽一 52, 318
田口精一 52, 318
田口哲志 17, 47, 53, 57, 67, 85, 256, 319, 364, 480
竹内 俊文 28, 45, 55, 61, 146, 244, 339, 409
武岡真司 33, 179
武岡由樹 40, 216
竹腰 和馬 55, 344
竹下遙 44, 239
武田充人 33, 180
武田香織 41, 217
武田直也 37, 43, 63, 196, 230, 426, 435
竹中智香 60, 397
武部純 48, 271
武輪能明 18, 30, 86, 156
多湖萌野 60, 395
巽英介 18, 30, 86, 156
建畠祥司 22, 112
楯芳樹 64, 437
田中 和沙 68, 482
田中知成 53, 59, 63, 326, 386, 425
田中　直毅 38, 50, 61, 205, 294, 407
田中秀典 31, 167
田中裕史 30, 158
田中賢 35, 43, 47, 48, 50, 57, 62, 67, 191, 236, 259, 267, 289, 361, 416, 476, 477
田中隆介 61, 405
谷田恵太 62, 414
谷本　幸太郎 54, 330
種市さくら 29, 152
田畑泰彦 60, 61, 62, 63, 394, 405, 413, 430
田原義朗 51, 60, 302, 398
多部田郁絵 42, 228
玉田靖 43, 57, 234, 369
田村篤志 19, 30, 50, 59, 66, 95, 161, 288, 388, 463
田村和則 48, 268
田村典子 47, 258
田村幸彦 25, 124
太良　修平 34, 186
譚　振権 25, 126

ち

陳 国平 43, 53, 63, 229, 323, 427, 428
陳亜州 43, 229
近江祥平 64, 438
チッテリオダニエル 65, 457
知念宙 51, 306
千葉晶彦 31, 165
千葉里沙子 47, 258
張佳蓉 53, 325
チュアノイ サヤン 28, 150
チュウ　モウチェン 52, 318
趙 益成 62, 417
張宏 27, 138
張永巍 17, 34, 84, 184
陳曦 47, 256
陳　鵬 25, 47, 48, 66, 123, 261, 266, 459
朱麗君 64, 441

つ

崔シン楠 25, 124
塚原剛彦 61, 408
築谷朋典 18, 30, 86, 156
柘植美礼 39, 211
辻井敬亘 57, 67, 362, 478
辻 ゆきえ 68, 482
土戸　優志 69, 488
土谷 享 32, 41, 173, 221
土屋　香織 25, 31, 63, 130, 171, 424
土屋笙子 65, 448
土谷 平 60, 396
土谷智史 68, 483
筒井藍 20, 100
津々木　博康 56, 354
堤　祐介 25, 47, 48, 66, 123, 261, 266, 459
坪井亮 50, 295
坪子侑佑 30, 159
津村尚史 20, 22, 100, 107
露谷政人 61, 401
都留　寛治 32, 49, 173, 276

て

鄭　雄一 26, 134
寺井渉 64, 440
寺内正彦 59, 388
寺田　知里 59, 382
寺田堂彦 65, 454
寺村裕治 17, 80
テルカウイアラー 24, 118, 119
田園 24, 118

と

戸井田 瞳 47, 259
遠山聖子 62, 415
外川　大起 38, 205
外川理絵 59, 387
徳生ひかる 37, 198
徳田真由美 53, 328
徳永滋彦 30, 157
徳永優斗 52, 313
利根川朝人 50, 288
利根川純一 18, 92
富田直秀 31, 170
友岡康弘 54, 336, 337
豊田武士 26, 134
土井直樹 46, 251
土居　壽 25, 47, 48, 66, 123, 261, 266, 459
土井豊 26, 133
道法志帆 57, 369
堂脇聖史 51, 298

な

内藤 瑞 28, 69, 150, 489
永井亜希子 47, 56, 258, 356
永井重徳 49, 279
中井志保 50, 293
永井展裕 53, 324
中尾愛子 58, 378
中岡竜介 68, 485
中川　篤 65, 448
中川泰宏 45, 61, 248, 408
永川栄泰 58, 375
長﨑健 51, 298
長崎幸夫 51, 304
中澤浩二 22, 52, 106, 313
長澤真理 43, 230
中澤靖元 34, 186
中路正 39, 47, 57, 210, 260, 362
長島 舟 27, 137
中島　武彦 20, 98
中島忠章 54, 336, 337
長嶋比呂志 48, 265
中嶌 悠介 38, 205
長瀬健一 18, 52, 60, 61, 63, 93, 317, 400, 402, 429
長田和歩 63, 426
永田幸平 48, 265
中田大貴 29, 153
永田拓也 60, 63, 399, 434
中田克 18, 37, 87, 201
永田勇貴 18, 93
中辻博貴 52, 310
中西健太 51, 301
中西周次 43, 237
中西淳 51, 297
中西　陽平 41, 226
中野和明 48, 265

中野貴由 23, 35, 41, 56, 115, 190, 219, 226, 358
中野剛志 66, 465
中野法彦 57, 367
長濱宏治 51, 62, 301, 423
中原一郎 48, 268
中村　仁 39, 213
中村奈緒子 20, 39, 102, 206
中村典史 25, 127
中村陽香 64, 438
中村 真紀 23, 25, 116, 129
中村　美穂 20, 101
中村侑介 62, 419
中村雄太 62, 415
中村義一 26, 67, 134, 475
永安武 68, 483
中康博 62, 421
仲山賢一 35, 188
長屋昌樹 48, 265
中山正道 18, 51, 92, 306
中矢亮太 48, 268
名倉百華 33, 178
成田武文 18, 57, 89, 365
成田　裕司 18, 88
成田 侑祐里 38, 205
鳴瀧　彩絵 39, 213

に

新居　輝樹 63, 430
新留琢郎 34, 56, 185, 354
新山瑛理 24, 122
西岡　悟 58, 372
西川靖俊 39, 58, 214, 376
西口昭広 17, 57, 67, 85, 364, 480
西宏基 62, 421
西崎　宏 59, 382
西崎　真理子 59, 382
西澤松彦 53, 324
西田　絵利香 49, 274
西田未来 39, 210
西田光夫 31, 167
西村嘉純 47, 260
西村光洋 55, 342
西村　真之介 50, 285
西村 勇哉 28, 146
西山今日子 54, 329
二宮　孝文 41, 226

ぬ

布目　祥子 48, 270
沼田　香織 34, 186

ね

根尾 昌志 20, 62, 101, 418
根岸淳 17, 43, 84, 233
根岸洋一 29, 152
根本慎太郎 33, 182
根本知己 27, 138
根本遼 61, 402

の

野上知徳 52, 311
野口恵一 50, 290
野口貴史 52, 308
埜口友里 55, 348
野崎浩佑 25, 47, 126, 261
野添悦郎 25, 127
信岡宏明 46, 250
野村祐介 26, 47, 56, 67, 134, 259, 359, 475, 477

は

葩島由二 26, 47, 56, 57, 67, 68, 134, 259, 359, 366, 475, 477, 485
計田大希 40, 215
萩森政頼 50, 55, 292, 342
橋本薫 49, 278
橋本祥吾 52, 314
橋本　剛 69, 488
橋本保 39, 210
橋本朋子 57, 369
橋本良秀 17, 34, 39, 43, 58, 62, 84, 184, 206, 233, 373, 422
長谷川雅考 22, 105
畠山翔 64, 440
畠山真由美 56, 353
畠賢一郎 31, 41, 168, 217
秦 信子 47, 259
秦正樹 48, 271
畑山博哉 57, 365
服部　夏衣 34, 186
服部能英 51, 298
波床　舞 59, 382
花田幸太郎 25, 127
花屋賢吾 63, 429
塙　隆夫 25, 47, 48, 66, 123, 261, 266, 459
濱井瞭 25, 41, 63, 130, 218, 424
濱崎景子 68, 483
濱崎雅成 24, 31, 118, 166
浜田賢一 67, 473
濱田英敏 48, 268
濱田　祐成 52, 316
早川　清雄 19, 95
早川　徹 25, 48, 59, 125, 269, 387
早川なつき 61, 409
林建一郎 25, 126
林 幸壱朗 32, 51, 173, 299
早下　隆士 69, 488
林信実 39, 212
原瑛紀 53, 326
ハラ　エミリオ 48, 267
原口裕次 22, 113
原島秀吉 33, 180
原　伸太郎 47, 257
原田明 55, 349
原田敦史 50, 61, 293, 401
原田　彩花 56, 354
原田浩之 48, 273
原朋也 63, 425
原 正之 43, 232
原涼大 20, 99
春風宏樹 20, 102
半田祥真 44, 240
馬場一慈 41, 218
馬場俊輔 59, 63, 386, 425
板東舜一 48, 268
畔堂佑樹 23, 115
伴雅人 22, 105

ひ

東垣達也 66, 462
東大樹 64, 443
東　大志 16, 74
東野美玲 52, 308
樋口 久美子 23, 116
久永真 68, 483
久本　秀明 65, 453
菱村亮介 31, 166
兵頭克弥 59, 384
平井敬悟 20, 98
平井晴香 47, 67, 259, 477
平尾見三 47, 258
平賀徹 44, 238
平川弘幸 20, 100
平田　伊佐雄 54, 57, 330, 368
平塚崇浩 31, 41, 168, 217
平野　雄基 28, 147
平野義明 33, 39, 43, 50, 52, 58, 62, 65, 181, 208, 231, 291, 307, 372, 418, 458
平林利香 64, 447
昼田智子 24, 117
蛭田勇樹 63, 65, 429, 457
比留間瞳 67, 477
廣江綾香 52, 318
廣瀬志弘 52, 314
廣瀬諒 37, 199
廣田　正嗣 25, 48, 125, 269
廣本祥子 25, 127

ふ

黄安祺 59, 386
深澤　今日子 49, 68, 275, 486
福井千恵 26, 47, 56, 67, 134, 259, 359, 475
福島啓斗 24, 117
福田明子 68, 483
福田淳二 64, 69, 437, 487
福田直志 49, 276
藤井和夫 26, 133
藤井　友博 67, 474
藤條惠 61, 402
藤枝洋暁 27, 136
藤枝俊宣 33, 179
藤木政志 59, 387
藤里俊哉 39, 58, 62, 206, 373, 422
藤澤彩乃 26, 134
藤田聡 56, 60, 350, 392
藤林俊介 24, 39, 58, 117, 212, 379
伏見英生 41, 217
藤本慎司 40, 215
藤原壮一郎 33, 63, 182, 434
舟木　健太 66, 464

舩本誠一 17, 34, 43, 84, 184, 233
麓伸太郎 55, 342
古川哲史 47, 258
古薗勉 55, 58, 66, 345, 347, 380, 468
古田雅一 56, 358
古谷　真衣子 48, 270

へ

ヘンド　アルハサン 24, 119

ほ

宝満　健太郎 31, 166
星野友 25, 124
星　憲幸 25, 125
干場隆志 22, 23, 45, 57, 67, 108, 114, 247, 362, 478
細川和生 54, 65, 336, 337, 452
堀田正人 26, 133
保延慶紀 47, 67, 259, 477
堀内　尚紘 25, 126
堀口諭吉 65, 455
堀雄一 68, 485
誉田栄一 67, 473
本田みちよ 39, 47, 58, 59, 214, 262, 376, 387
本田義知 53, 58, 59, 63, 326, 380, 386, 425
本間健太 56, 352

ま

米谷芳枝 61, 402
前川敏彦 31, 168
前田　亨 52, 312
前田瑞夫 27, 54, 65, 139, 336, 337, 452
前田利菜 46, 253
前野　健一 65, 453
前原明梨 46, 250
牧田昌士 39, 58, 214, 376
牧野　公子 63, 430
正本一誉 39, 212
正本和誉 24, 117
眞下泰正 53, 61, 320, 406
増田造 56, 360
増永慎一郎 51, 298
松井桂子 31, 167
松井崚 54, 337
松浦昂紀 51, 298
松垣あいら 41, 56, 219, 226, 358
松川良平 48, 271
松崎典弥 52, 62, 310, 421
松下幸平 26, 134
松下大志 37, 195
松田秀一 24, 39, 58, 117, 212, 379
松田仁美 47, 259
松永　久美子 64, 446
松永透 68, 485
松永行子 19, 96
松橋祐輝 30, 47, 67, 159, 259, 477
松林秀繁 31, 167
松前元 24, 118, 119
松村和明 39, 47, 64, 210, 260, 440
松元　亮 69, 489
松本桂太郎 68, 483
松本晋太朗 45, 246
松本卓也 22, 48, 59, 63, 111, 267, 389, 432
松本 拓也 65, 448
松本尚之 53, 326
松本大樹 55, 339
松本　蛍 62, 415
松本 有 28, 146
松本　連平 20, 98
真野隆充 49, 276
馬原淳 33, 39, 181, 207, 208
馬渕清資 68, 485
眞弓 佳代子 25, 129
丸川恵理子 48, 273
丸橋卓磨 51, 299
丸山 厚 37, 56, 60, 204, 360, 397
馬渡なみ 35, 191

み

三浦　博己 25, 125
三浦　宏之 25, 126
三浦雄介 50, 55, 292, 342
三浦佳子 25, 124
三重正和 53, 61, 320, 406
三上敬太 46, 249
右田聖 58, 374
水川裕貴 65, 450
水田涼介 28, 149
水野敏秀 18, 30, 86, 156
水野陽介 53, 319
水野梨瑚 60, 398
溝口昂太郎 65, 451
溝口聡 68, 483
溝口　大剛 56, 354
溝口裕二 43, 231
光井俊人 17, 82
味寺克哉 66, 470
南浦亮介 58, 380
南畑　孝介 52, 316
南裕之 37, 197
宮浦英樹 47, 259
宮澤　雄太 56, 354
宮治 裕史 25, 49, 129, 274
宮島敦子 57, 67, 366, 477
宮田完二郎 28, 69, 150, 489
宮武伸一 49, 281
宮田昌悟 64, 444
宮田　隆志 28, 52, 54, 60, 64, 144, 147, 308, 332, 396, 447
宮原裕二 27, 65, 69, 135, 455, 489
宮部さやか 40, 215
宮本大輔 22, 52, 106, 313
宮本洋二 49, 276
名井　陽 16, 76

む

向井貞篤 18, 37, 91, 199
向高弘 65, 457
村上　望 35, 187
村井 利昭 55, 344
村上大樹 35, 62, 191, 416
村上達也 25, 124
村上　智亮 34, 186
村上義彦 50, 51, 54, 61, 285, 290, 300, 338, 403, 411, 412
村司雄一 27, 136
村田勇樹 27, 55, 140, 341
村山 恵司 37, 204

も

最上譲二 65, 458
目代貴之 26, 132
望月　慎一 45, 243
茂木龍一 39, 210
本山奈菜 56, 354
百鳥直樹 61, 405
森岡智子 60, 394
森　貴翔 45, 244
森實一晃 39, 58, 212, 379
森重雄 39, 212
森下明彦 47, 259
森下裕貴 26, 47, 56, 67, 134, 259, 359, 475, 477
森高敦 45, 243
森田佳歩 51, 302
森　健 62, 415
森田健一 20, 22, 100, 107
森田侑宜 26, 133
森 英樹 43, 232
森本康一 40, 57, 216, 367
森本尚樹 16, 17, 64, 77, 82, 442
森本 直也 38, 205
森本展行 28, 53, 65, 145, 328, 458
守本祐司 33, 179
森山啓司 25, 128
森山幸祐 56, 68, 350, 482
森優 41, 218
森祐輔 56, 355
森悠太 54, 338
森　良之 49, 275
門雅莉 57, 365

や

八尾健 41, 223
矢下亜紀良 55, 344
屋代英彦 41, 52, 222, 314
安田彩人 49, 277
安永茉由 52, 314
矢谷博文 23, 115
柳沢俊樹 49, 277
矢野玄 52, 314
矢野宥人 45, 245
矢渕翼 61, 406
薮塚武史 24, 41, 42, 58, 117, 220, 223, 227, 377
矢部　淳 59, 389
山内柊平 43, 235
山内優佳 54, 330
山内行玄 46, 251

山岡哲二 16, 18, 33, 39, 43, 50, 57, 58, 75, 90, 181, 183, 207, 208, 231, 234, 291, 369, 372
山岸健人 33, 179
山口和夫 51, 297
山口花帆 66, 467
山口聰 59, 384, 388
山口誠二 31, 39, 169, 212
山口知己 44, 238
山崎淳司 52, 314
山崎俊正 53, 327
山崎智彦 58, 374
山崎萌 54, 333
山下暁立 17, 34, 84, 184
山下　仁大 25, 56, 126, 356
山科憂佳 31, 164
山添泰宗 55, 340
山添正博 47, 258
山田 託也 28, 61, 146, 409
山田　大空 65, 453
山田将博 20, 102
山田勇磨 33, 180
山田佳之 45, 241
山田莉央 60, 399
山田理沙 47, 261
大和　雅之 17, 18, 22, 51, 64, 83, 92, 113, 306, 445
山中昭浩 64, 438
山中浩気 18, 64, 90, 442
山本 安希 68, 482
山本玲子 31, 34, 172, 185
山本一裕 28, 143
山本克史 59, 390
山本　今日子 57, 64, 361, 441
山本翔太 51, 297
山本敬史 31, 164
山本雄嗣 59, 387
山本洋輝 28, 148
山本雅哉 28, 30, 53, 65, 145, 162, 328, 458
山本光哉 37, 196
山本遼太郎 53, 320
鎗野目健二 27, 138
楊　英俊 63, 428

ゆ

由井　伸彦 19, 37, 50, 52, 59, 66, 95, 194, 288, 315, 384, 388, 463
湯川優一 52, 310
杠和樹 45, 242
柚木俊二 18, 57, 89, 365
弓場英司 50, 61, 293, 401
由留部崇 40, 216
ユンツィイーヤン 59, 381
尹　徳栄 59, 385

よ

楊元元 48, 272
楊立群 28, 141
養王田正文 50, 290
横井理史 47, 263
横井涼 47, 257
横川善之 26, 133
横川亮祐 52, 307
横田 敦司 20, 101
横田　琴音 48, 270
横田倫啓 39, 41, 58, 214, 224, 376
余語利信 51, 299
横山夏海 22, 108
横山英明 46, 253
吉井　俊貴 20, 98
吉岡拓哉 41, 220
吉川千晶 23, 57, 67, 114, 362, 478
能崎優太 28, 33, 49, 51, 60, 63, 66, 148, 182, 280, 281, 305, 399, 434, 461
吉治仁志 60, 399
吉田 碧衣 28, 146
吉田英史 48, 269
吉田郁也 62, 420
吉田萌 55, 343
吉田亮 56, 352
吉永直人 33, 69, 177, 489
吉成　正雄 25, 125
吉原彬文 45, 241
吉満亮介 68, 484
吉峰　茂樹 48, 59, 272, 382, 385
吉村卓也 25, 127
依田哲也 59, 384
米岡修一郎 61, 408
米田滉平 60, 392
廉鐘旻 66, 469

り

李建新 28, 141
リージュン　チェン 53, 324

わ

若林秀光 26, 133
若林　真理 22, 107
若林里衣 51, 60, 302, 398
若山暖乃 60, 400
和久　友則 38, 50, 61, 205, 294, 407
渡邉慎 42, 227
渡邉里奈 63, 426
和田愛以 61, 407
王　亜明 59, 389
王　広欣 59, 389
王　秀惠 53, 323
王　新竜 63, 428
王　昊 31, 165

A

Abe Jiro 33, 180
Abe Kodai 39, 214
Abe L. Gabriela 20, 103
Abe Masahiro 67, 476
Abe Toshiaki 53, 324
Adachi Masaki 23, 116
Adomi Ryo 50, 284
Aiko Nakao 58, 378
Aizawa Mamoru 39, 41, 47, 48, 49, 58, 59, 214, 224, 262, 265, 279, 376, 387
Ajiro Hiroharu 46, 55, 250, 345
Akagi Takami 54, 64, 329, 438
Akasaka Hiroaki 28, 146
Akashi Mitsuru 54, 64, 329, 438
Akashi Yusuke 62, 413
Akemi Kikuta 31, 172
Akihiko Kikuchi 49, 60, 282, 395
Akimoto Aya 18, 93
Akimoto Mizutani Aya 56, 352
Akinori Kuzuya 49, 281
Akira Matsumoto 69, 489
Akira Tuchiya 32, 173
Akita Kazuya 49, 276
Akiyaka Yudai 51, 301
Akiyama Yoshikatsu 22, 113
Akiyama Yoshitsugu 27, 65, 139, 452
Akiyoshi Kazunari 18, 33, 37, 48, 91, 178, 199, 273
Akiyoshi Taniguchi 53, 325
Alaa Fehaid 60, 393
Alhasan Hend 24, 118
Amano Hizuru 33, 179
Anada Takahisa 25, 41, 59, 63, 130, 218, 381, 424
Anamizu Mina 67, 479
Ando Wataru 48, 268
Anraku Masaki 47, 257
Anraku Yasutaka 28, 150
Aoki Kazuhiro 25, 124
Aoki Takashi 66, 464
Aoyagi Atsushi 48, 271
Aoyagi Kenta 31, 165
Aoyagi Takao 45, 248
Aoyama Jo 62, 418
Aoyama Seika 62, 423
Aoyma Yusuke 67, 477
Araki Hiroko 23, 116
Aratsu Fumihiro 43, 236
Arima Yusuke 37, 200
Arisaka Yoshinori 37, 52, 59, 66, 194, 315, 384, 463
Asahara Haruyasu 56, 351
Asayama Shoichiro 29, 152
Ashida Maki 25, 48, 66, 123, 266, 459
Asoh Taka-Aki 24, 37, 55, 56, 66, 121, 202, 349, 351, 462
Atsushi Iwai 31, 167
Atsushi Mahara 39, 207, 208
Atsushi Maruyama 37, 204
Aya Kitamura 69, 488
Ayano Eri 61, 402
Azuma Akihiko 31, 41, 168, 217
Azuma Tomoyuki 37, 45, 195, 241
Azuma Yoshinao 55, 66, 345, 347, 468

B

Baba Kazuyoshi 41, 218
Baba Shunsuke 59, 63, 386, 425
Babita Shashni 33, 54, 175, 335

Bae Ji-Myung 20, 103
Ban Masahito 22, 105
Bando Yuki 23, 115
Bandou Shunichi 48, 268
Bungo Otsuki 24, 117

C

Chang Chiajung 53, 325
Chen Guoping 43, 53, 63, 229, 323, 427, 428
Chen Luyuan 59, 385
Chen Peng 25, 48, 66, 123, 266, 459
Chen Xi 47, 256
Chen Yazhou 43, 229
Chiaki Yoshikawa 23, 114
Chiba Akihiko 31, 165
Chiba Risako 47, 258
Chihiro Ishizaki 24, 117
Chikae Shohei 64, 438
Chinen Hiroshi 51, 306
Cho Ik Sung 62, 417
Chou Fangyu 47, 257
Chuanoi Sayan 28, 150
Chuaychob Surachada 65, 449
Citterio Daniel 65, 457
Cui Xinnan 25, 124

D

Doi Hisashi 25, 48, 66, 123, 266, 459
Doi Naoki 46, 251
Doi Yutaka 26, 133
Dowaki Satoshi 51, 298

E

Ebara Mitsuhiro 18, 24, 39, 45, 61, 88, 122, 211, 248, 408
Ebata Hiroyuki 68, 482
Edatsune Goro 18, 93
Egawa Satoru 20, 98
Egusa Hiroshi 23, 115
Eisuke Tatsumi 18, 30, 86, 156
Emilio Satoshi Hara 63, 432
Endo Tatsuro 65, 453
Enrica Verne 31, 169
Etsuro Nozoe 25, 127
Ezumi Masayuki 41, 217

F

Fabrice Soncin 19, 96
Fillip Witkowski 31, 172
Francesco Baino 31, 169
Fujibayashi Shunsuke 39, 58, 212, 379
Fujie Toshinori 33, 179
Fujieda Hiroaki 27, 136
Fujieda Kei 61, 402
Fujii Kazuo 26, 133
Fujii Tomohiro 67, 474
Fujiki Masashi 59, 387
Fujimoto Shinji 40, 215
Fujisato Toshiya 39, 58, 62, 206, 373, 422
Fujisawa Ayano 26, 134
Fujita Satoshi 56, 60, 350, 392
Fujiwara Soichiro 33, 63, 182, 434
Fukazawa Kyoko 49, 68, 275, 486
Fukuda Akiko 68, 483
Fukuda Junji 64, 437
Fukuda Naoyuki 49, 276
Fukui Chie 26, 47, 56, 67, 134, 259, 359, 475
Fumihiko Kajii 31, 167
Fumoto Shintaro 55, 342
Funaki Kenta 66, 464
Funamoto Seiichi 17, 34, 43, 84, 184, 233
Furuta Masakazu 56, 358
Furuya Maiko 48, 270
Furuzono Tsutomu 55, 58, 66, 345, 347, 380, 468
Fushimi Hideo 41, 217

G

Gan Ning 61, 410
Gao Beiyuan 59, 386
Glen S. Kwon 49, 282
Goda Tatsuro 27, 65, 135, 455
Goto Koji 39, 58, 212, 379
Goto Masahiro 51, 52, 60, 302, 316, 398
Gotoh Ken 49, 282
Gotoh Yohko 53, 327
Gu Zhongwei 28, 141

H

Hagimori Masayori 50, 55, 292, 342
Haishima Yuji 26, 47, 56, 57, 67, 68, 134, 259, 359, 366, 475, 477, 485
Hakata Taiki 40, 215
Hamada Hidetoshi 48, 268
Hamada Kenichi 67, 473
Hamada Yusei 52, 316
Hamai Ryo 41, 63, 218, 424
Hamai Ryou 25, 130
Hamasaki Keiko 68, 483
Hamasaki Masanari 24, 118
Han Aifang 20, 103
Hanawa Takao 25, 48, 66, 123, 266, 459
Hanaya Kengo 63, 429
Handa Shoma 44, 240
Hara Eiki 53, 326
Hara Emilio 48, 267
Hara Emiliosatoshi 22, 111
Hara Masayuki 43, 232
Hara Ryota 20, 99
Hara Shintaro 47, 257
Hara Tomoya 63, 425
Harada Akira 55, 349
Harada Atsushi 50, 61, 293, 401
Harada Ayaka 56, 354
Harada Hiroyuki 48, 273
Harashima Hideyoshi 33, 180
Harukaze Hiroki 20, 102
Haruo Asai 31, 167
Hasegawa Masataka 22, 105
Hashimoto Kaoru 49, 278
Hashimoto Shogo 52, 314
Hashimoto Tamotsu 39, 210
Hashimoto Tomoko 57, 369
Hashimoto Yoshihide 17, 34, 39, 43, 58, 62, 84, 184, 206, 233, 373, 422
Hata Kenichiro 41, 217
Hata Kenichro 31, 168
Hata Masaki 48, 271
Hata Shinko 47, 259
Hatakeyama Mayumi 56, 353
Hatakeyama Sho 64, 440
Hatoko Mai 59, 382
Hattori Natsui 34, 186
Hattori Yoshihide 51, 298
Hayakawa Natsuki 61, 409
Hayakawa Sumio 19, 95
Hayakawa Tohru 25, 48, 59, 125, 269, 387
Hayashi Koichiro 51, 299
Hayashi Makoto 39, 212
Hend Alhasan 24, 119
Hideaki Yokoyama 46, 253
Hideki Mori 43, 232
Hidenari Kayano 60, 395
Hideshige Matsubayashi 31, 167
Hidetoshi Kumata 53, 321
Higashi Daiki 64, 443
Higashi Taishi 16, 74
Higashigaki Tatsuya 66, 462
Higashino Misato 52, 308
Higuchi Kumiko 23, 116
Hirabayashi Rika 64, 447
Hiraga Toru 44, 238
Hirai Haruka 47, 67, 259, 477
Hirai Keigo 20, 98
Hirakawa Hiroyuki 20, 100
Hirano Yoshiaki 33, 50, 52, 58, 62, 65, 181, 291, 307, 372, 418, 458
Hirano Yosiaki 43, 231
Hirano Yuki 28, 147
Hirao Kenzo 47, 258
Hirata Isao 54, 57, 330, 368
Hiratsuka Takahiro 31, 41, 168, 217
Hiroe Ayaka 52, 318
Hirofumi Miyaji 25, 49, 129, 274
Hiromichi Kurosu 57, 369
Hiromoto Sachiko 25, 127
Hironobu Ono 49, 274
Hirose Motohiro 52, 314
Hirose Ryo 37, 199
Hirosuke Hatayama 57, 365
Hirota Masatsugu 25, 48, 125, 269
Hiroyuki Asamuma 37, 204
Hiroyuki Kobayashi 69, 488
Hiroyuki Miura 25, 126
Hiruma Hitomi 67, 477
Hiruta Yuki 63, 65, 429, 457
Hisamoto Hideaki 65, 453
Hisashi Doi 47, 261
Hishimura Ryosuke 31, 166
Hitoshi Furusho 54, 335

Honda Eiichi 67, 473
Honda Michiyo 39, 47, 58, 59, 214, 262, 376, 387
Honda Yoshitomo 53, 58, 59, 63, 326, 380, 386, 425
Honma Kenta 56, 352
Honobe Yoshinori 47, 67, 259, 477
Horacio Cabral 33, 177
Hori Yuichi 68, 485
Horiguchi Yukichi 65, 455
Hoshi Noriyuki 25, 125
Hoshiba Takashi 22, 23, 45, 57, 67, 108, 114, 247, 362, 478
Hoshino Yu 25, 124
Hosokawa Kazuo 54, 65, 336, 337, 452
Hotta Masato 26, 133
Huang Anqi 59, 386
Hurukawa Tetsushi 47, 258
Hyo Kyoung Kwon 22, 113
Hyodo Katsuya 59, 384
Hyukjin Lee 22, 113

I

Ichimaru Hiroaki 56, 354
Ichinose Hirofumi 56, 353
Ida Yuta 35, 193
Ide Chizuka 57, 367
Ide Junichi 31, 164
Igarashi Kaoru 48, 270
Igarashi Kazunori 28, 146
Ihara Kensuke 47, 258
Ii Masaaki 33, 58, 182, 372
Ikeda Yusuke 61, 406
Ikedo Yui 24, 121
Ikegami Ryo 46, 251
Ikoma Toshiyuki 47, 54, 263, 334
Ikuko Sakamaki 25, 129
Imanishi Yuka 48, 271
Imato Keiichi 37, 43, 63, 196, 230, 426
Imazato Satoshi 20, 103
Inanaga Daimu 18, 93
Inomata Shoko 65, 452
Inomata Yasumasa 66, 459
Inoue Chigusa 65, 453
Inoue Fumihito 29, 151
Inoue Yasuaki 28, 147
Inoue Yuki 47, 259
Inoue Yuuki 49, 67, 275, 477
Iohara Keishi 59, 387
Irie Shinji 52, 310
Ise Hirohiko 53, 64, 327, 446
Iseki Sachiko 52, 315
Ishi Mitsutoshi 68, 483
Ishihara Kazuhiko 43, 47, 49, 67, 68, 237, 259, 275, 477, 486
Ishihara Masatou 22, 105
Ishihara Ryo 24, 54, 65, 121, 336, 337, 452
Ishii Yoshio 41, 217
Ishikawa Kunio 32, 41, 49, 173, 221, 276
Ishikawa Masahito 43, 237
Ishimaru Yoshiki 55, 66, 345, 468
Ishimoto Takuya 16, 23, 73, 115
Ishizaki Chihiro 58, 377
Isobe Jun 37, 200
Isoyama Takashi 47, 257
Itaka Keiji 33, 177
Ito Atsuo 41, 52, 222, 314
Ito Kaori 61, 404
Ito Rina 41, 224
Ito Shun 53, 324
Ito Taichi 53, 322
Ito Teppei 20, 99
Itoi Eiji 41, 218
Itou Yuzuru 23, 116
Iwai Soichi 54, 329
Iwamaru Yoshifumi 51, 297
Iwamatsu Tadashi 20, 100
Iwanami Kaori 25, 128
Iwasaki Kiyotaka 30, 47, 67, 159, 259, 477
Iwasaki Norimasa 24, 31, 118, 119, 165
Iwasaki Yasuhiko 20, 43, 44, 101, 235, 238
Iwashita Hiroko 68, 485
Iwata Takamasa 67, 471
Iwatsu Misato 26, 132
Izawa Keiko 64, 439

J

Jankova Atanasova 57, 361
Jin Meihua 22, 107
Jo Ayaki 52, 307
Jo Junichiro 62, 413
Jo Jun-Ichiro 60, 394
Jons.Hilborn 16, 72
Joris Pauty 19, 96
Junji Fukuda 69, 487

K

K. Sudesh Kumar 56, 351
Kadota Junpei 62, 422
Kagami Sanae 49, 279
Kageyama Tatsuto 64, 437
Kaji Hirokazu 53, 324
Kaji Kosuke 60, 399
Kajima Yuka 25, 123
Kakehashi Kodai 26, 133
Kakehata Masayuki 41, 52, 222, 314
Kakinoki Sachiro 58, 62, 372, 418
Kakinoki Satirou 52, 307
Kakinuma Chihaya 31, 168
Kamakura Shinji 49, 277
Kambe Yusuke 33, 43, 50, 183, 231, 291
Kamimura Masao 55, 343
Kamioka Hiroshi 63, 432
Kamiya Noriho 51, 52, 60, 302, 316, 398
Kanai Satoshi 31, 165
Kanako Shitomi 25, 49, 129, 274
Kanaoka Hiroaki 39, 213
Kanazawa Hideko 18, 52, 60, 61, 63, 93, 317, 400, 402, 429
Kanehira Yuya 20, 99
Kanekiyo Kenji 57, 367
Kaneko Kotaro 57, 363
Kaneko Masahiro 43, 237
Kanetaka Hiroyasu 26, 48, 55, 132, 270, 346
Kanie Kei 18, 88
Kanji Tsuru 32, 173
Kanjiro Miyata 69, 489
Kannaka Kento 65, 457
Kanzawa Nobuyuki 64, 439
Kaori Shima 25, 127
Kasai Hitoshi 62, 414
Kasanuki Hiroshi 30, 159
Kashiwazaki Aki 43, 236
Kasuga Toshihiro 35, 39, 41, 58, 189, 214, 219, 376
Katagiri Asuka 54, 336, 337
Kataoka Kazunori 28, 33, 150, 177
Katata Chihiro 20, 103
Katayama Yoshiki 62, 415
Kato Koichi 54, 57, 330, 368
Kato Masatoshi 37, 202
Kato Nobuhiro 40, 57, 216, 367
Kato Reiko 57, 67, 366, 477
Kato Ryuji 18, 88
Katsuhisa Sakaguchi 22, 113
Kaung Kyaw 56, 354
Kawagishi Kouki 66, 461
Kawahara Kosuke 41, 226
Kawai Koji 55, 344
Kawai Toshiyuki 39, 58, 212, 379
Kawakami Hayato 55, 344
Kawakami Hiroyoshi 29, 152
Kawakami Ryosuke 27, 138
Kawakami Shigeru 50, 51, 55, 292, 303, 342
Kawakami Tsuyoshi 56, 359
Kawaki Harumi 26, 133
Kawamura Akifumi 28, 52, 54, 60, 64, 144, 147, 308, 332, 396, 447
Kawamura Yuki 52, 318
Kawanishi Ryuto 53, 63, 321, 433
Kawasaki Daiki 65, 453
Kawasaki Riku 48, 51, 273, 298
Kawashita Masakazu 26, 44, 45, 132, 240, 246
Kawata Tomotoshi 39, 212
Kawazoe Naoki 53, 63, 323, 427, 428
Kayashima Hiroki 23, 115
Kayoko Mayumi 25, 129
Kazuhiko Ishihara 57, 58, 66, 370, 378, 469
Kazuki Takasima 41, 225
Kazunari Akiyoshi 28, 149
Kazunori Kataoka 69, 489
Kazuto Kobayashi 57, 365
Keiji Itaka 25, 126
Keiji Murayama 37, 204
Keiko Matsui 31, 167
Keita Sakakibara 23, 114
Keito Fukushima 117
Kengo Kasai 46, 253
Kenichiro Hayashi 25, 126
Kenishi Kume 25, 127
Kenji Koga 25, 129

Kenji Kusumoto 17, 82
Kentaro Homan 31, 166
Kidoaki Satoru 68, 482
Kidokoro Yasutaka 41, 223
Kiguchi Kentaro 28, 146
Kikuchi Akihiko 16, 18, 24, 27, 39, 51, 54, 65, 79, 92, 121, 122, 139, 211, 306, 336, 337, 452
Kikuchi Masanori 25, 128
Kim Ahram 51, 304
Kim Beob Soo 28, 150
Kim Hyun Jin 28, 150
Kimihiro Yamashita 25, 126
Kimiko Makino 63, 430
Kiminami Keishi 48, 265
Kimoto Katsuhiko 25, 125
Kimura Kazunori 27, 139
Kimura Tsuyoshi 20, 39, 58, 62, 102, 206, 373, 422
Kimura Yuka 22, 104
Kimurasuda Hiromi 20, 99
Kinoshita Naoya 48, 273
Kirihata Mitsunori 51, 298
Kirino Izumi 33, 179
Kishida Akio 17, 20, 34, 39, 43, 58, 62, 84, 102, 184, 206, 233, 373, 422
Kishida Ryo 59, 383
Kishimura Akihiro 28, 62, 150, 415
Kitagaki Hisashi 39, 212
Kitahara Yoshiro 67, 474
Kitane Ryoichi 65, 452
Kitaoka Takuya 56, 353
Kitayama Yukiya 28, 45, 55, 61, 146, 244, 339, 409
Kitta Kumiko 47, 259
Kiyoji Sugimoto 57, 365
Kizukuri Rihoko 49, 279
Kobatake Eiry 53, 61, 320, 406
Kobayashi Jun 64, 445
Kobayashi Mako 58, 373
Kobayashi Naohiro 66, 466
Kobayashi Shingo 43, 47, 50, 67, 236, 259, 289, 477
Kodama Yukinobu 55, 342
Koeda Sayaka 50, 294
Koga Yoko 27, 136
Kogai Yasumichi 55, 347
Kogai Yasumiti 58, 380
Koguchi Ryohei 57, 361
Kohzo Ito 46, 253
Koichiro Hayashi 32, 173
Koizumi Daisuke 59, 387
Koji Goto 24, 117
Koji Nagahama 62, 423
Kojima Chie 38, 205
Kojima Hideto 51, 296
Kojima Kentaro 33, 39, 181, 208
Kojima Norinaga 48, 271
Kokabu Terufumi 31, 165
Komai Shiori 48, 264
Komasa Satoshi 48, 59, 272, 382, 385
Komasa Yutaka 59, 382
Komatsu Shuhei 24, 121
Komoriya Kaoru 57, 67, 366, 477
Komuro Hiroaki 47, 56, 258, 356
Kondo Mayuka 39, 58, 206, 373
Kondo Shin-Ichi 46, 251
Kono Ken 68, 482
Koseki Yoshitaka 62, 414
Kosuke Kurosu 54, 335
Kosuke Nozaki 47, 261
Kotaro Hanada 25, 127
Koyama Jun 49, 275
Koyashiki Kento 50, 291
Kubo Hirotaka 18, 91
Kuboki Thasaneeya 68, 482
Kubota Megumi 63, 433
Kumagai Naoki 67, 477
Kumagai Tomohiro 68, 484
Kunii Saori 40, 57, 216, 367
Kunio Ishikawa 59, 383
Kunitomi Yosuke 63, 432
Kurimoto Rio 39, 211
Kurobe Hirotsugu 16, 78
Kuroda Kensuke 56, 66, 355, 467
Kuroda Naotaka 50, 292
Kuroda Ryosuke 40, 216
Kushiro Keiichiro 47, 257
Kushiro Keiichirou 37, 195
Kusumoto Tetsuji 59, 382
Kuzuya Akinori 28, 33, 49, 51, 60, 63, 66, 148, 182, 280, 305, 399, 434, 461
Kuzuya Masayuki 46, 251

L

Lai Zhouran 67, 477
Lee Hyukjin 64, 445
Lee Kyubae 63, 427
Lee Sungho 41, 219
Li Jianxin 28, 141
Liang Xu 31, 166
Li-Jiun Chen 53, 324
Liqun Ruan 41, 225
Liu Yihua 39, 207

M

Mabuchi Kiyoshi 68, 485
Maeda Mizuo 27, 54, 65, 139, 336, 337, 452
Maeda Tohru 52, 312
Maehara Akari 46, 250
Maekawa Toshihiko 31, 168
Maeno Kenichi 65, 453
Mahara Atsushi 33, 181
Maitani Yoshie 61, 402
Maki Ashida 47, 261
Maki Nakamura 25, 129
Makita Masashi 39, 58, 214, 376
Makoto Hisanaga 68, 483
Mano Takamitsu 49, 276
Maria Chiara Munisso 17, 39, 82, 207
Marta Miola 31, 169
Maruhashi Takuma 51, 299
Marukawa Eriko 48, 273
Maruyama Atsushi 56, 60, 360, 397
Masahiro Fujita 65, 449
Masamoto Kazutaka 24, 39, 117, 212
Masanari Hamasaki 31, 166
Masayuki Yamato 22, 113
Mashimo Yasumasa 53, 61, 320, 406
Masuda Tsukuru 56, 360
Masunaga Shinichiro 51, 298
Matsuda Hitomi 47, 259
Matsuda Shuichi 39, 58, 212, 379
Matsugaki Aira 41, 56, 219, 226, 358
Matsuhashi Yuki 30, 47, 67, 159, 259, 477
Matsui Ryo 54, 337
Matsukawa Ryouhei 48, 271
Matsumae Gen 24, 118, 119
Matsumoto Hiroki 55, 339
Matsumoto Hotaru 62, 415
Matsumoto Keitarou 68, 483
Matsumoto Naoyuki 53, 326
Matsumoto Shintaro 45, 246
Matsumoto Takuya 22, 48, 59, 63, 65, 111, 267, 389, 432, 448
Matsumoto Yu 28, 146
Matsumura Kazuaki 39, 47, 64, 210, 260, 440
Matsunaga Kumiko 64, 446
Matsunaga T. Yukiko 19, 96
Matsunaga Toru 68, 485
Matsusaki Michiya 52, 62, 310, 421
Matsushita Kohei 26, 134
Matsushita Taishi 37, 195
Matsuura Koki 51, 298
Matumoto Renpei 20, 98
Mawatari Nami 35, 191
Md. Raihan Chowdhury 51, 302
Megumi Kubota 53, 321
Men Yali 57, 365
Mie Masayasu 53, 61, 320, 406
Migita Satoshi 58, 374
Mikami Keita 46, 249
Minami Hiroyuki 37, 197
Minamihata Kosuke 52, 316
Minamiura Ryosuke 58, 380
Mitera Katsuya 66, 470
Mitsuhiro Ebara 18, 94
Mitsuo Nishida 31, 167
Mitsuru Naito 69, 489
Miura Hiromi 25, 125
Miura Yoshiko 25, 124
Miura Yusuke 50, 55, 292, 342
Miyabe Sayaka 40, 215
Miyahara Yuji 27, 65, 135, 455
Miyajima Atsuko 57, 67, 366, 477
Miyamoto Daisuke 22, 52, 106, 313
Miyamoto Youji 49, 276
Miyata Kanjiro 28, 150
Miyata Shogo 64, 444
Miyata Takashi 28, 52, 54, 60, 64, 144, 147, 308, 332, 396, 447
Miyaura Hideki 47, 259
Miyazawa Yuta 56, 354
Mizoguchi Daigou 56, 354

Mizoguchi Kotaro 65, 451
Mizoguchi Satoshi 68, 483
Mizoguchi Yuji 43, 231
Mizukawa Yuki 65, 450
Mizuno Riko 60, 398
Mizuno Toshihide 18, 30, 86, 156
Mizuno Yosuke 53, 319
Mizuo Maeda 65, 449
Mizuta Ryousuke 28, 149
Mochizuki Shinichi 45, 243
Moeno Tago 60, 395
Mogami George 65, 458
Mokudai Takayuki 26, 132
Momotori Naoki 61, 405
Mori Kisho 45, 244
Mori Shigeo 39, 212
Mori Takeshi 62, 415
Mori Yoshiyuki 49, 275
Mori Yu 41, 218
Mori Yusuke 56, 355
Mori Yuuta 54, 338
Morimoto Koichi 40, 57, 216, 367
Morimoto Naoki 16, 17, 64, 77, 82, 442
Morimoto Naoya 38, 205
Morimoto Nobuyuki 28, 53, 65, 145, 328, 458
Morimoto Yuji 33, 179
Morioka Tomoko 60, 394
Morishita Akihiko 47, 259
Morishita Yuki 26, 47, 56, 67, 134, 259, 359, 475
Morisita Yuki 67, 477
Morita Kaho 51, 302
Morita Kenichi 20, 22, 100, 107
Morita Yuki 26, 133
Moritaka Atsushi 45, 243
Moriyama Keiji 25, 128
Moriyama Kosuke 56, 68, 350, 482
Morizane Kazuaki 39, 58, 212, 379
Moteki Ryuichi 39, 210
Motohide Aoki 53, 321
Motoyama Nana 56, 354
Mukai Sada-Atsu 18, 37, 91, 199
Mukai Takahiro 65, 457
Murai Toshiaki 55, 344
Muraji Yuichi 27, 136
Murakami Daiki 35, 62, 191, 416
Murakami Nozomi 35, 187
Murakami Tatsuya 25, 124
Murakami Tomoaki 34, 186
Murakami Yoshihiko 50, 51, 54, 61, 285, 290, 300, 338, 403, 411, 412
Murata Yuki 27, 55, 140, 341
Myoi Akira 16, 76

N

Nagahama Koji 51, 301
Nagai Akiko 47, 56, 258, 356
Nagai Nobuhiro 53, 324
Nagai Shigenori 49, 279
Nagakawa Yoshiyasu 58, 375
Nagasaki Takeshi 51, 298
Nagasaki Yukio 51, 304
Nagasawa Mari 43, 230
Nagase Kenichi 18, 52, 60, 61, 63, 93, 317, 400, 402, 429
Nagashima Hiroshi 48, 265
Nagashima Shu 27, 137
Nagata Kazuho 63, 426
Nagata Kohei 48, 265
Nagata Takuya 60, 63, 399, 434
Nagata Yuki 18, 93
Nagaya Masaki 48, 265
Nagayasu Takeshi 68, 483
Naito Mitsuru 28, 150
Naka Yasuhiro 62, 421
Nakada Masaru 18, 37, 87, 201
Nakada Taiki 29, 153
Nakagawa Atsushi 65, 448
Nakagawa Yasuhiro 45, 61, 248, 408
Nakahara Ichiro 48, 268
Nakai Shiho 50, 293
Nakaji Tadashi 39, 210
Nakaji-Hirabayashi Tadashi 47, 57, 260, 362
Nakajima Tadaaki 54, 336, 337
Nakajima Takehiko 20, 98
Nakajima Yusuke 38, 205
Nakamura Haruka 64, 438
Nakamura Jin 39, 213
Nakamura Maki 23, 116
Nakamura Miho 20, 101
Nakamura Naoko 20, 39, 102, 206
Nakamura Yoshikazu 26, 67, 134, 475
Nakamura Yusuke 62, 419
Nakamura Yuta 62, 415
Nakanishi Jun 51, 297
Nakanishi Kenta 51, 301
Nakanishi Shuji 43, 237
Nakanishi Yohei 41, 226
Nakano Kazuaki 48, 265
Nakano Norihiko 57, 367
Nakano Takayoshi 23, 35, 41, 56, 115, 190, 219, 226, 358
Nakano Takeshi 66, 465
Nakaoka Ryusuke 68, 485
Nakatsuji Hirotaka 52, 310
Nakaya Ryota 48, 268
Nakayama Kenichi 35, 188
Nakayama Masamichi 18, 51, 92, 306
Nakazawa Kohji 22, 52, 106, 313
Nakazawa Yasumoto 34, 186
Nakura Momoka 33, 178
Nalinthip Chanthaset 46, 55, 250, 345
Nao Ikeuchi 37, 204
Naohiro Horiuchi 25, 126
Naoki Kawazoe 43, 229
Naoko Sano 57, 369
Naomi Otsuki 57, 369
Naoto Yoshinaga 69, 489
Narita Takefumi 18, 89
Narita Yuji 18, 88
Narita Yuri 38, 205
Natsuko Kakudo 17, 82
Natsumi Yokoyama 22, 108
Negishi Jun 17, 43, 84, 233
Negishi Yoichi 29, 152
Nemoto Ryo 61, 402
Nemoto Shintaro 33, 182
Nemoto Tomomi 27, 138
Neo Masashi 20, 62, 101, 418
Niidome Takuro 34, 185
Niidome Takurou 56, 354
Niiyama Eri 24, 122
Ninomiya Takafumi 41, 226
Nishi Koki 62, 421
Nishida Erika 49, 274
Nishida Miku 39, 210
Nishiguchi Akihiro 17, 57, 67, 85, 364, 480
Nishikawa Yasutoshi 39, 58, 214, 376
Nishimura Kazuki 47, 260
Nishimura Koyo 55, 342
Nishimura Shinnosuke 50, 285
Nishimura Yuya 28, 146
Nishioka Satoru 58, 372
Nishiyama Kyoko 54, 329
Nishizaki Hiroshi 59, 382
Nishizaki Mariko 59, 382
Nishizawa Matsuhiko 53, 324
Nobuoka Hiroaki 46, 250
Nogami Tomonori 52, 311
Noguchi Keiichi 50, 290
Noguchi Takafumi 52, 308
Noguchi Yuri 55, 348
Nomura Yusuke 26, 47, 56, 67, 134, 259, 359, 475, 477
Norifumi Nakamura 25, 127
Norimasa Iwasaki 31, 166
Nozaki Kousuke 25, 126
Numata Kaori 34, 186
Nunome Shoko 48, 270

O

Oai Keiko 58, 378
Obata Tomohiro 68, 483
Ochiai Takuro 56, 60, 360, 397
Oda Atsushi 64, 438
Oda Kazune 50, 284
Ogata Aika 18, 88
Ogawa Kumiko 26, 134
Ogawa Masato 61, 411
Ogawa Tomoyuki 45, 246
Ogino Shuichi 64, 442
Ohashi Moe 19, 95
Ohe Go 49, 276
Ohira Ryota 20, 102
Ohkubo Chikahiro 25, 125
Ohnaga Takashi 65, 454
Ohno Tsukasa 18, 88
Ohno Yuuta 65, 456
Ohsumi Koji 67, 474
Ohta Seiichi 53, 322
Ohta Yuji 56, 352
Ohtsu Naofumi 66, 467
Ohtsu Yohei 24, 120
Ohtsuki Chikara 39, 213

Ohya Yuichi 28, 33, 49, 51, 60, 63, 66, 148, 182, 280, 305, 399, 434, 461
Oikawa Fumiko 63, 435
Oike Kazuki 26, 133
Oishi Masako 56, 358
Oishi Tatsuya 25, 123
Oishi Yoshifumi 28, 145
Oishi Yumiko 19, 95
Okada Masahiro 22, 48, 59, 63, 111, 267, 389, 432
Okada Naoya 19, 97
Okamatsu Yoriko 67, 474
Okamoto Yoshihiro 56, 359
Okamura Ai 31, 41, 168, 217
Okamura Yosuke 27, 65, 138, 448
Okano Teruo 17, 18, 51, 64, 83, 92, 306, 445
Okawa Atusi 20, 98
Okawa Masashi 53, 322
Okazaki Joji 48, 59, 272, 382, 385
Okazaki Masayuki 56, 358
Oki Yuichiro 64, 436
Okido Masazumi 56, 66, 355, 467
Okikawa Yuki 22, 105
Okita Ichiho 51, 300
Okuno Shudai 62, 418
Okuzu Yaichiro 39, 212
Omae Kaoru 40, 57, 216, 367
Ono Katsuhiko 56, 354
Ono Kimika 37, 203
Ooba Wato 65, 458
Ooya Tooru 28, 50, 60, 61, 143, 284, 391, 410
Osada Kensuke 33, 177
Osaka Akiyoshi 59, 389
Osaka Naoya 39, 58, 214, 376
Oshita Mari 55, 347
Ota Ayumu 52, 317
Otaka Akihisa 20, 43, 44, 101, 235, 238
Otomo Kohei 27, 138
Otsuki Bungo 39, 58, 212, 379
Otuki Shuhei 62, 418
Ouchi Sosuke 24, 122
Owaki Mitsuhiro 66, 467
Oyane Ayako 23, 25, 116, 129
Ozaki Ryota 54, 332
Ozawa Naoki 48, 266
Ozawa Shogo 48, 271

P

Peng Chen 47, 261

Q

Qiu Muquan 52, 318

R

Rahman Md Moshikur 51, 302
Rajendran Arunkumar 52, 315
Riku Kawasaki 28, 149
Rina Maeda 46, 253
Risa Yamada 47, 261
Rui Wang 48, 270
Ryo Ishihara 49, 60, 282, 395
Ryota Kobayashi 46, 253

S

Saito Atsuhiro 45, 248
Saito Hiroki 66, 460
Saito Hiroshi 56, 358
Saito Yuta 58, 374
Sakaguchi Toshikazu 39, 210
Sakai Rina 68, 485
Sakai Susumu 25, 130
Sakai Yasuyuki 64, 446
Sakakibara Keita 57, 67, 362, 478
Sakamoto Michiharu 64, 442
Sakamoto Wataru 51, 299
Sakamoto Yuki 56, 64, 67, 357, 442, 471
Sakemoto Ryu 60, 391
Sakurai Yoshinori 51, 298
Sameshima Kei 47, 67, 259, 477
Sano Kohei 65, 457
Santa Hokuto 24, 66, 121, 463
Sara Ferraris 31, 169
Sasai Yasushi 46, 251
Sasaki Daisuke 33, 180
Sasaki Hitoshi 55, 342
Sasaki Jun-Ichi 20, 103
Sasaki Keiichi 31, 63, 171, 424
Sasaki Makoto 34, 185
Sasaki Mizuki 43, 234
Sasaki Nene 64, 439
Sasaki Ryohei 28, 146
Sasaki Saori 68, 482
Sasaki Yoshihiro 18, 33, 37, 48, 91, 178, 199, 273
Sasano Tetsuo 47, 56, 258, 356
Sasayama Satoshi 63, 425
Sato Marino 41, 221
Sato Rikiya 67, 476
Sato Ryouya 67, 472
Sato Takumi 61, 403
Sato Tomoya 63, 424
Sato Yuto 50, 286
Satoshi Ohara 25, 126
Sawa Tomohiro 56, 354
Sawada Hiroshi 41, 226
Sawada Kazuki 65, 457
Sawada Rumi 68, 482
Sawada Shin-Ichi 18, 33, 37, 91, 178, 199
Sawada Toshiki 52, 312
Segami Yuto 62, 416
Seiichi Ohta 64, 66, 436, 465
Seki Airi 54, 331
Sekida Shogo 43, 236
Sekino Tohru 59, 385
Serizawa Takeshi 52, 312
Shakya Ajay 22, 109
Sharon Claudia Notodihardjo 17, 82
Sheng-Han Chen 68, 486
Shiho Douho 57, 369
Shikinami Yasuo 58, 379
Shimabukuro Masaya 47, 261
Shimada Naohiko 37, 56, 60, 204, 360, 397
Shimakawa Kaede 48, 265
Shimizu Takayoshi 39, 58, 212, 379
Shimizu Tatsuya 17, 63, 83, 435
Shimizu Tomohiro 20, 99
Shimizu Yoshihisa 51, 297
Shimizu Yu 39, 212
Shimoda Ryota 22, 105
Shimura Masaki 63, 429
Shin Seongjin 20, 103
Shin-Ichi Myatake 49, 281
Shin-Ichi Sawada 28, 149
Shinji Kamakura 31, 167
Shinohara Marie 64, 446
Shinsuke Ohba 64, 436
Shirakawa Minori 43, 234
Shiraku Hideyuki 64, 444
Shirato Haruki 30, 163
Shiwaku Yukari 25, 31, 41, 63, 130, 171, 218, 424
Shuichi Matsuda 24, 117
Shunji Yunoki 57, 365
Shuno Tomohiro 62, 415
Shunsuke Fujibayashi 24, 117
Shuntaro Uenuma 46, 253
Silvia Spriano 31, 169
Soga Kohei 55, 343
Soma Kai 31, 167
Sonoda Toshiki 35, 191
Sonotaki Seiichi 50, 290
Sotome Shinichi 20, 98
Sudo Hideki 31, 165
Sue Shin-Ichiro 56, 350
Suematsu Yoshitaka 17, 81
Sueyoshi Kenji 65, 453
Suga Tadaharu 50, 292
Sugano Nobuhiko 48, 268
Suganuma Kyoko 67, 476
Sugawara Natsumi 67, 476
Sugawara Akihide 55, 349
Sugawara-Narutaki Ayae 39, 213
Sugimori Fumiaki 20, 100
Sugimoto Hikaru 33, 176
Sugimoto Shunsuke 43, 235
Sugino Ryusei 50, 62, 287, 415
Sugiura Kousaku 49, 283
Sugiyama Kohei 46, 251
Suma Tomoya 28, 150
Sumida Hiromichi 51, 305
Suna Shinichiro 35, 187
Sunayama Hirobumi 45, 55, 244, 339
Suyalatu 58, 374
Suye Shinichiro 60, 392
Suzuki Ginga 25, 125
Suzuki Kanae 26, 132
Suzuki Nobuya 54, 334
Suzuki Osamu 25, 31, 41, 53, 59, 63, 130, 171, 218, 326, 381, 424
Syuuhei Komatsu 49, 282

T

Tabata Yasuhiko 60, 61, 62, 394, 405, 413
Tabeta Ikue 42, 228
Tadashi Kawai 31, 167
Tagawa Yoh-Ichi 52, 318
Taguchi Seiichi 52, 318
Taguchi Tetsushi 17, 47, 57, 67, 85, 256, 364, 480
Tahara Yoshiro 51, 60, 302, 398
Taichi Ito 64, 66, 436, 465
Taka-Aki Asoh 60, 395
Takadama Hiroaki 31, 169
Takahashi Daisuke 24, 118, 119
Takahashi Hironobu 17, 63, 83, 435
Takahashi Isao 33, 179
Takahashi Taiga 27, 138
Takahashi Tsutomu 61, 412
Takahata Masahiko 20, 99
Takai Hiroki 33, 182
Takai Madoka 37, 45, 47, 195, 241, 257
Takai Shigeomi 41, 42, 58, 220, 223, 227, 377
Takaichi Atsushi 25, 123
Takano Eri 45, 55, 244, 339
Takao Hanawa 47, 261
Takao Masaki 48, 268
Takao Seiji 59, 382
Takarada Tohru 27, 139
Takashi Hayashita 69, 488
Takashi Koga 25, 127
Takashima Kazuma 48, 268
Takashima Yoshinori 55, 349
Takayoshi Shimizu 24, 117
Takebe Jun 48, 271
Takeda Atsuhito 33, 180
Takeda Kaori 41, 217
Takeda Naoya 37, 43, 63, 196, 230, 426, 435
Takefumi Narita 57, 365
Takegoshi Kazuma 55, 344
Takehiko Ishii 69, 489
Takenaka Tomoka 60, 397
Takeoka Shinji 33, 179
Takeoka Yoshiki 40, 216
Takeshi Hashimoto 69, 488
Takeshi Yabutsuka 24, 117
Takeshita Haruka 44, 239
Takeuchi Toshifumi 28, 45, 55, 61, 146, 244, 339, 409
Takuya Kawakami 67, 481
Takuya Yoshimura 25, 127
Tamada Yasushi 43, 234
Tamura Atsushi 19, 30, 50, 59, 66, 95, 161, 288, 388, 463
Tamura Kazunori 48, 268
Tamura Noriko 47, 258
Tamura Yukihiko 25, 124
Tanaka Hidenori 31, 167
Tanaka Hiroshi 30, 158
Tanaka Kazusa 68, 482
Tanaka Masaru 35, 43, 47, 48, 50, 57, 62, 67, 191, 236, 259, 267, 289, 361, 416, 476, 477
Tanaka Naoki 38, 50, 61, 205, 294, 407
Tanaka Ryuusuke 61, 405
Tanaka Tomonari 53, 59, 63, 326, 386, 425
Taneichi Sakura 29, 152
Tanimoto Kotaro 54, 330
Tanita Keita 62, 414
Tara Shuhei 34, 186
Tate Yoshiki 64, 437
Tatehata Shoji 22, 112
Tatsuto Kageyama 69, 487
Tatsuya Shimizu 22, 113
Tatsuya Uchida 53, 321
Terada Chisato 59, 382
Terada Dohiko 65, 454
Terai Wataru 64, 440
Teramura Yuji 17, 80
Terauchi Masahiko 59, 388
Terkawi Alaa 24, 118, 119
Teruki Nii 63, 430
Tetsu Takahashi 31, 167
Tetsuji Yamaoka 39, 57, 207, 208, 369
Tetsushi Taguchi 53, 319
Tian Yuan 24, 118
Tien Minh Le 17, 82
Togawa Diki 38, 205
Togawa Rie 59, 387
Toida Hitomi 47, 259
Tokuda Mayumi 53, 328
Tokunaga Shigehiko 30, 157
Tokunaga Yuto 52, 313
Tokusei Hikaru 37, 198
Tomita Naohide 31, 170
Tomohiro Onodera 31, 166
Tomoko Hiruta 24, 117
Tomonari Umemura 53, 321
Tomonori Tsukiya 18, 30, 86, 156
Tomooka Yasuhiro 54, 336, 337
Tonegawa Asato 50, 288
Tonegawa Junichi 18, 92
Tooru Ooya 62, 417
Toshihito Mitsui 17, 82
Toshiro Kibe 25, 127
Toshiyuki Kawai 24, 117
Toyama Shoko 62, 415
Toyoda Takeshi 26, 134
Tsai Meng-Yu 43, 236
Tsuboi Ryo 50, 295
Tsuboko Yusuke 30, 159
Tsuchiya Akira 41, 221
Tsuchiya Kaori 31, 63, 171, 424
Tsuchiya Shoko 65, 448
Tsuchiya Taira 60, 396
Tsuchiya Tomoshi 68, 483
Tsuge Mirei 39, 211
Tsuji Yukie 68, 482
Tsujii Yoshinobu 57, 67, 362, 478
Tsukahara Takehiko 61, 408
Tsumura Takashi 20, 22, 100, 107
Tsunenori Kameda 57, 369
Tsuru Kanji 49, 276
Tsutomu Sugaya 49, 274
Tsutsui Ai 20, 100
Tsutsuki Hiroyasu 56, 354
Tsutsumi Yusuke 25, 48, 66, 123, 266, 459
Tsuyutani Masato 61, 401
Tutiya Kaori 25, 130
Tya Indah Arifta 59, 383

U

Uchida Hiroaki 33, 182
Uchida Satoshi 33, 177
Uchikoshi Tetsuo 25, 128
Uchiyama Shino 50, 292
Ueda Ayano 47, 262
Ueda Hiroshi 64, 440
Ueda Kyosuke 26, 131
Ueda Mamoru 58, 380
Ueda Mayu 58, 376
Ueda Tomoya 62, 416
Uehara Hiroki 50, 289
Uemira Toshimasa 22, 107
Uemukai Toru 55, 58, 347, 380
Uemura Toshimasa 20, 100
Uemura Yo 20, 22, 100, 107
Ueno Takayoshi 30, 160
Ueno Yoshiyuki 27, 136
Uezono Masayoshi 25, 128
Ujihira Masanobu 68, 485
Umebayashi Nobuhiro 41, 222
Umeda Koji 66, 468
Umeyama Ryoya 49, 281
Umezawa Masakazu 55, 343
Umezu Mitsuo 30, 159
Ungil Chung 26, 134
Uozumi Aoi 28, 144
Uraoka Toshio 18, 89
Usuba Ryo 19, 96
Uto Koichiro 18, 88, 94
Uwaizumi Chigusa 31, 164
Uyama Emi 67, 473
Uyama Hiroshi 37, 55, 56, 66, 202, 349, 351, 462

V

Veronica Peretti 31, 169

W

Wada Mei 61, 407
Wahyu Ramadhan 52, 316
Wakabayashi Hidemitsu 26, 133
Wakabayashi Mari 22, 107
Wakabayashi Rie 51, 60, 302, 398
Wakayama Haruno 60, 400
Waku Tomoniri 38, 205
Waku Tomonori 50, 61, 294, 407
Wang Guangxin 59, 389
Wang Hao 31, 165
Wang Rui 55, 346
Wang Xinlong 63, 428
Wang Xiuhui 53, 323

Wang Yaming 59, 389
Watanabe Rina 63, 426
Watanabe Shin 42, 227
Wei Xu 39, 209
Wojciech Święszkowski 31, 172
Woo Yong Kim 31, 166
Wu Jiang 32, 174
Wu Weiting 56, 351

X

Xiao Linghao 31, 171

Y

Yabe Atsushi 59, 389
Yabuchi Tsubasa 61, 406
Yabutsuka Takeshi 41, 58, 220, 223, 377
Yabutsukatakeshi 42, 227
Yaichiro Okuzu 24, 117
Yamada Hirotaka 65, 453
Yamada Masahiro 20, 102
Yamada Rio 60, 399
Yamada Takuya 28, 61, 146, 409
Yamada Yoshiyuki 45, 241
Yamada Yuma 33, 180
Yamagishi Kento 33, 179
Yamaguchi Kaho 66, 467
Yamaguchi Kazuo 51, 297
Yamaguchi Satoshi 59, 384, 388
Yamaguchi Seiji 31, 39, 169, 212
Yamaguchi Tomoki 44, 238
Yamamoto Aki 68, 482
Yamamoto Akiko 31, 34, 172, 185
Yamamoto Hiroki 28, 148
Yamamoto Katsushi 59, 390
Yamamoto Kazuhiro 28, 143
Yamamoto Kyoko 57, 64, 361, 441
Yamamoto Masaya 28, 30, 53, 65, 145, 162, 328, 458
Yamamoto Mitsuya 37, 196
Yamamoto Ryotaro 53, 320
Yamamoto Shota 51, 297
Yamamoto Takashi 31, 164
Yamamoto Takatsugu 59, 387
Yamanaka Akihiro 64, 438
Yamanaka Hiroki 18, 64, 90, 442
Yamaoka Tetsuji 43, 231
Yamaoka Tetsuji 16, 18, 33, 43, 50, 58, 75, 90, 181, 183, 234, 291, 372
Yamashina Yuka 31, 164
Yamashita Akitatsu 17, 34, 84, 184
Yamashita Kimihiro 56, 356
Yamato Masayuki 17, 18, 51, 64, 83, 92, 306, 445
Yamauchi Shuhei 43, 235
Yamauchi Yuka 54, 330
Yamauchi Yukinori 46, 251
Yamazaki Atsushi 52, 314
Yamazaki Moe 54, 333
Yamazaki Tomohiko 58, 374
Yamazaki Toshimasa 53, 327
Yamazoe Hironori 55, 340
Yamazoe Masahiro 47, 258
Yanagisawa Toshiki 49, 277
Yang Liqun 28, 141
Yang Yingjun 63, 428
Yang Yuanyan 48, 272
Yano Gen 52, 314
Yano Yuto 45, 245
Yao Takeshi 41, 223
Yarinome Kenji 27, 138
Yashiro Hidehiko 41, 52, 222, 314
Yashita Akira 55, 344
Yasuda Ayato 49, 277
Yasuhiko Tabata 63, 430
Yasunaga Mayu 52, 314
Yasushi Tamada 57, 369
Yatani Hirofumi 23, 115
Yin Derong 59, 385
Yoda Tetsuya 59, 384
Yogo Toshinobu 51, 299
Yohda Masafumi 50, 290
Yokoi Ryo 47, 257
Yokoi Satoshi 47, 263
Yokokawa Ryosuke 52, 307
Yokota Atsushi 20, 101
Yokota Kotone 48, 270
Yokota Tomohiro 39, 41, 58, 214, 224, 376
Yoneda Kohei 60, 392
Yoneoka Shuichiro 61, 408
Yoshiaki Hirano 39, 208
Yoshiaki Takewa 18, 30, 86, 156
Yoshida Aoi 28, 146
Yoshida Eiji 48, 269
Yoshida Fumiya 62, 420
Yoshida Moe 55, 343
Yoshida Ryo 56, 352
Yoshigawa Yoshiyuki 26, 133
Yoshihara Akifumi 45, 241
Yoshihiro Sasaki 28, 149
Yoshii Toshitaka 20, 98
Yoshiji Hitoshi 60, 399
Yoshikawa Chiaki 57, 67, 362, 478
Yoshimi Ohyabu 57, 365
Yoshimine Shigeki 48, 59, 272, 382, 385
Yoshimitsu Ryosuke 68, 484
Yoshinaga Naoto 33, 177
Yoshinari Masao 25, 125
Yoshioka Takuya 41, 220
Yoshizaki Yuta 28, 33, 49, 51, 60, 63, 66, 148, 182, 280, 305, 399, 434, 461
Yu Shimizu 117
Yuan Xida 52, 309
Yuba Eiji 50, 61, 293, 401
Yufeng Zheng 41, 225
Yui Nobuhiko 19, 37, 50, 52, 59, 66, 95, 194, 288, 315, 384, 388, 463
Yuichi Ohya 49, 281
Yuji Haraguchi 22, 113
Yuji Miyahara 69, 489
Yuji Tsuchido 69, 488
Yukawa Yuichi 52, 310
Yuki Inoue 58, 378
Yuki Sakamoto 67, 472
Yuki Sugiura 32, 173
Yukichi Horiguchi 54, 335
Yukio Nagasaki 33, 54, 175, 335
Yum Jongmin 66, 469
Yuna Kasai 69, 488
Yunoki Shunji 18, 89
Yunzhi Yang 59, 381
Yurube Takashi 40, 216
Yusuke Kambe 39, 207
Yusuke Tsutsumi 47, 261
Yuta Yoshizaki 49, 281
Yuuki Inoue 57, 66, 370, 469
Yuzuriha Kazuki 45, 242

Z

Zaizen Kinuko 47, 259
Zeng Yuhao 59, 385
Zhang Hong 27, 138
Zhang Honghao 48, 272
Zhang Ren 35, 192
Zhang Yongwei 17, 34, 84, 184
Zhenquan Tan 25, 126
Zhu Lijun 64, 441